

機能性ディスペプシア治療薬アコチアミドの胃組織集積機構

著者	平山 雅通
著者別表示	HIRAYAMA Masamichi
雑誌名	博士論文本文Full
学位授与番号	13301甲第5082号
学位名	博士（創薬科学）
学位授与年月日	2020-03-22
URL	http://hdl.handle.net/2297/00060050

doi: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00894>.

機能性ディスペプシア治療薬アコチアミドの
胃組織集積機構

平山 雅通

2020 年 1 月

博士論文

機能性ディスペプシア治療薬アコチアミドの 胃組織集積機構

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

創薬科学専攻

薬物動態学研究室

学 籍 番 号 1429012008

氏 名 平山 雅通

主任指導教員名 玉井 郁巳

目次

第1章 序論	6
第2章 アコチアミド皮下投与時のラット胃組織移行	12
第1節 緒言	12
第2節 方法	13
2-1 試薬	13
2-2 実験動物及び飼育環境	13
2-3 試験方法	14
2-4 データ解析方法	16
第3節 結果	18
第4節 考察	23
第3章 培養胃細胞株におけるアコチアミド取り込みの検討	25
第1節 緒言	25
第2節 方法	26
2-1 試薬	26
2-2 Hs 746T 細胞の培養	26
2-3 Hs 746T 細胞における取り込み試験	26
2-4 タンパク定量	27
2-5 データ解析方法	27
2-6 統計解析	28
第3節 結果	29
3-1 Hs 746T 細胞へのアコチアミド取り込みの時間依存性	29
3-2 Hs 746T 細胞へのアコチアミド取り込みの濃度依存性	30
3-3 Hs 746T 細胞へのアコチアミド取り込みにおける駆動力の検討	31
3-4 アコチアミド取り込みに対するトランスポーター阻害剤の検討	32
3-5 アコチアミド取り込みに対する fluvoxamine の濃度依存的阻害の検討	34
第4節 考察	35
第4章 トランスポーター発現細胞を用いたアコチアミド取り込みの検討	39
第1節 緒言	39
第2節 方法	40
2-1 試薬	40
2-2 細胞の培養	40
2-3 SERT、DAT、および NET 一過性過剰発現細胞における取り込み試験	41
2-4 トランスポーター安定発現細胞 (OCT1-CHO 細胞、OCT2-CHO 細胞、OATP1B1-CHO 細胞、OATP1B3-CHO 細胞、OATP1B3-MDCKII 細胞、OAT1-CHO 細胞、OAT3-	

HEK293 細胞、MATE1-MDCKII 細胞、MATE2-K-MDCKII 細胞)における取り込み試験	41
2-5 OCT3 一過性過剰発現細胞における取り込み試験	42
2-6 PMAT 一過性過剰発現細胞における取り込み試験	43
2-7 タンパク定量	44
2-8 データ解析方法	44
2-9 統計解析	44
2-10 免疫組織化学的染色	45
第3節 結果	46
3-1 SERT、DAT、NET によるアコチアミド取り込み試験	46
3-2 OCT1、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、OATP1B3、OAT1、OAT3、MATE1、MATE2-K によるアコチアミド取り込み試験	48
3-3 PMAT によるアコチアミド取り込みの時間依存性	50
3-4 PMAT によるアコチアミド取り込みの濃度依存性	51
3-5 PMAT によるアコチアミド取り込みにおける駆動力の検討	52
3-6 PMAT によるアコチアミド取り込みに対する阻害剤の検討	53
3-7 ヒト胃組織における PMAT タンパク質の局在	54
第4節 考察	55
第5章 結論	59
第6章 謝辞	61
第7章 引用文献	62
第8章 参考文献	75

略語一覽

略語	定義
ACATN	Acetyl-CoA Transporter
ACh	Acetylcholine
AChE	Acetylcholine esterase
AUC	Area under the curve
ASBT	Apical sodium-dependent bile acid transporter
BCRP	Breast cancer resistance protein
C_{\max}	Maximum measured drug concentration
CHO	Chinese hamster ovary
CYP	Cytochrome P450
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAT	Dopamine transporter
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ENT	Equilibrative nucleoside transporter
EPS	Epigastric pain syndrome
E3S	Estrone-3-sulfate
FBS	Fetal bovine serum
FD	Functional Dyspepsia
HBSS	Hank's buffered salt solution
HEK	Human embryonic kidney
HPLC	High performance liquid chromatography
IC_{50}	50% inhibitory concentration
K_i	Drug inhibition constant
K_m	Michaelis-menten constant
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MATE	Multidrug and toxin extrusion transporter
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MPP+	1-methyl-4-phenylpyridinium
MRP	Multidrug resistance associated protein
NET	Norepinephrine transporter
NMG	N-methylglucamine
OAT	Organic anion transporter
OCT	Organic cation transporter

OATP	Organic anion transporting polypeptide
PAH	<i>p</i> -Aminohippuric acid
PBS	Phosphate buffered saline
PBPK	Physiologically based pharmacokinetics
PD	Pharmacodynamics
PDS	Postprandial distress syndrome
PMAT	Plasma membrane monoamine transporter
PEPT1	Oligopeptide transporter 1
P-gp	P-glycoprotein
SE	Standard error
SD	Standard Deviation
SERT	Serotonin transporter
SSRIs	Selective serotonin reuptake inhibitors
TEA	Tetraethylammonium
T _{1/2}	Time of first occurrence of maximum measured drug concentration
T _{max}	Half life
UGT	Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase
VMAT	Vesicular monoamine transporter.

第1章 序論

機能性ディスぺプシア (Functional dyspepsia, FD) は、国際的な診断基準である Rome 基準 [1]において、胃及び十二指腸領域から発生する「辛いと感じる食後のもたれ感」、「早期飽満感」、「心窩部痛」または「心窩部灼熱感」といった自覚症状を呈するが、内視鏡検査などによっても原因となる器質的疾患が特定できない症状をいう。その期間は「6ヶ月以上前から症状があり、最近3ヶ月間は辛いと感じる食後のもたれ感、早期飽満感、心窩部痛及び心窩部灼熱感のうち1つ以上の症状があり、かつその原因となりそうな器質的疾患が確認されない場合」にFDと診断されると定義されている[1]。FDの病態は十分に解明されていないものの、胃前庭部運動の低下や胃排出の遅延などの消化管運動異常、知覚異常(内臓知覚過敏)、胃適応性弛緩障害、心理社会的因子(ストレス)など様々な要因が複合的に関与しているとされている[2,3]。FD患者においては、胃運動の低下や胃排出の遅延などの消化管運動異常が認められることから、消化管運動を亢進させ、消化管機能を改善することがFDに対する治療法の一つとして期待されている。

一般に、消化管運動は自律神経支配により調節され、副交感神経が消化管運動の亢進に働くと考えられ、神経伝達物質であるアセチルコリン(以下、ACh)は消化管平滑筋のムスカリン(主にムスカリンM3)受容体を刺激することで消化管の収縮を誘発する。一方、遊離されたAChがアセチルコリンエステラーゼ(AChE)により速やかに分解されることから、消化管運動調節においてAChの分解を抑制して消化管運動を亢進させることは重要であると考えられる[4]。1990年代に消化管運動改善薬として世界的に広く使用されたシサプリドは心血管系への重篤な副作用により販売中止となり、現在ではセロトニン5-HT₄受容体作動薬(モサプリド)やドパミンD₂受容体拮抗薬(イトプリド)などが消化管運動改善薬として使用されている。しかし、これまでFD患者を対象に製造販売を承認されたFD治療薬は存在しなかった。したがって、消化管運動を亢進させるためにAChの分解を抑制することは、FDを治療するうえで重要であると考えられる。そこで、ゼリア新薬工業株式会社は

ACHe の阻害作用に基づいた消化管の運動亢進作用に着目して、選択的かつ強力な作用を有する化合物の薬効スクリーニングを実施した。その結果、アコチアミド塩酸塩水和物（以下、アコチアミド）を候補化合物として見出し、2000 年よりアコチアミドの臨床試験に着手した。

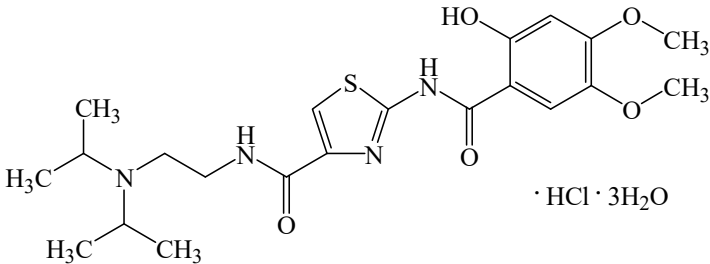


Figure 1-1. Chemical structure of acotiamide

薬理試験において、アコチアミドはヒトリコンビナント AChE 阻害作用を示し、その阻害は選択的かつ可逆性であった[5]。アコチアミドはモルモット胃摘出標本において ACh 誘発収縮及び電気刺激収縮を増強させた[5]。また、イヌおよびラットの胃にストレインゲージフォーストランスデューサーを縫着し、覚醒下における胃運動に対する作用を検討した結果、アコチアミドは胃運動亢進作用を示した[6]。さらに、アコチアミドはアドレナリン $\alpha 2$ 受容体作動薬であるクロニジンの投与によって惹起させた胃運動低下モデルおよび胃排出遅延モデルなどの消化管機能低下に対して改善効果を示した[7]。また、アコチアミドの安全性試験は、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験及び抗原性試験が実施され、ヒトへの安全性が懸念されるような所見は報告されていない[10]。

臨床試験においては、第 III 相試験で Rome III 基準に適合した FD 患者を対象に有効性を検討した結果、被験者の印象の改善率および 3 症状（食後の膨満感、上腹部膨満感および早期満腹感）の消失率共に本剤 1 回 100 mg 投与群でプラセボ群より有意に高い値を示し、本剤の FD に対する有効性が確認された[8]。以上の結果を含めて非臨床及び臨床における有効性及び安全性が認められ、2013 年 3 月に「機能性ディスペプシアにおける食後の膨満感、

上腹部膨満感、早期満腹感の消化器症状」を適応症として本邦において世界で初めての製造販売承認を取得した。

薬物動態特性については、放射性標識体及び非標識体を使用した種々の *in vitro* 及び *in vivo* 試験によって情報が得られている。吸収特性については、アコチアミドをラット及びイヌに 3~30 mg/kg の投与量で単回経口投与した時の生物学的利用率 (F) は、ラットで 13.9%~19.0%、イヌで 27.8%~50.4%を示すことが報告されている[10]。また、イヌに¹⁴C]アコチアミドを 30 mg/kg の用量で十二指腸内に投与し、定量的オートラジオグラフィー法 (ARG) 法により組織中濃度を測定したところ、胃組織で検出された放射能は胃底部付近、胃体部付近及び胃前庭部付近ではほぼ同等であった。血液中放射能濃度は、投与後 0.5 時間で最高濃度 2,117 ng eq./mL (4.70 µmol eq./L) を示し、その後は経時的に低下して 4 時間後に 512 ng eq./mL (1.14 µmol eq./L) の濃度になった。血漿中放射能濃度についても血液中放射能濃度と同様に推移し、投与後 0.5 時間で最高濃度 2,310 ng eq./mL (5.13 µmol eq./L) を示し、その後は経時的に低下して 4 時間後に 653 ng eq./mL (1.45 µmol eq./L) の濃度になった。胃底部、胃体部及び胃前庭部付近の放射能濃度は、いずれの部位においても血液中濃度と共に投与後 0.5 時間で最高濃度 643~835 ng eq./g (1.43~1.85 nmol eq./g) を示した。更に、胃組織のそれぞれの部位の放射能濃度は、投与後 4 時間で 201~272 ng eq./g (0.446~0.604 nmol eq./g) であり、胃組織に高濃度に分布していた[10]。また、ラットとイヌにおける胃での局在検討により、筋層間神経叢に AChE が局在しており、アコチアミドを 30 mg/kg の用量でラットに皮下投与したところ、AChE50%阻害濃度 (IC₅₀) である 2.3 µM を越える 8.5 µM の胃組織アコチアミド濃度が確認された(投与後 30 分)[9]。クリアランスに関しては、吸収されたアコチアミドは一部グルクロン酸抱合を受ける。主に UGT1A(特に、1A9 と 1A8) に触媒される反応を介して、一次代謝物として、N-デスプロピルアコチアミド、6 種類の二次グルクロン酸抱合体代謝物に変化する。代謝産物のアセチルコリンエステラーゼ阻害作用は極めて低いとされる。排泄経路は主に胆汁であるが、約 30~40%は未変化体、及び代謝物として尿

中に排泄される[10,11]。

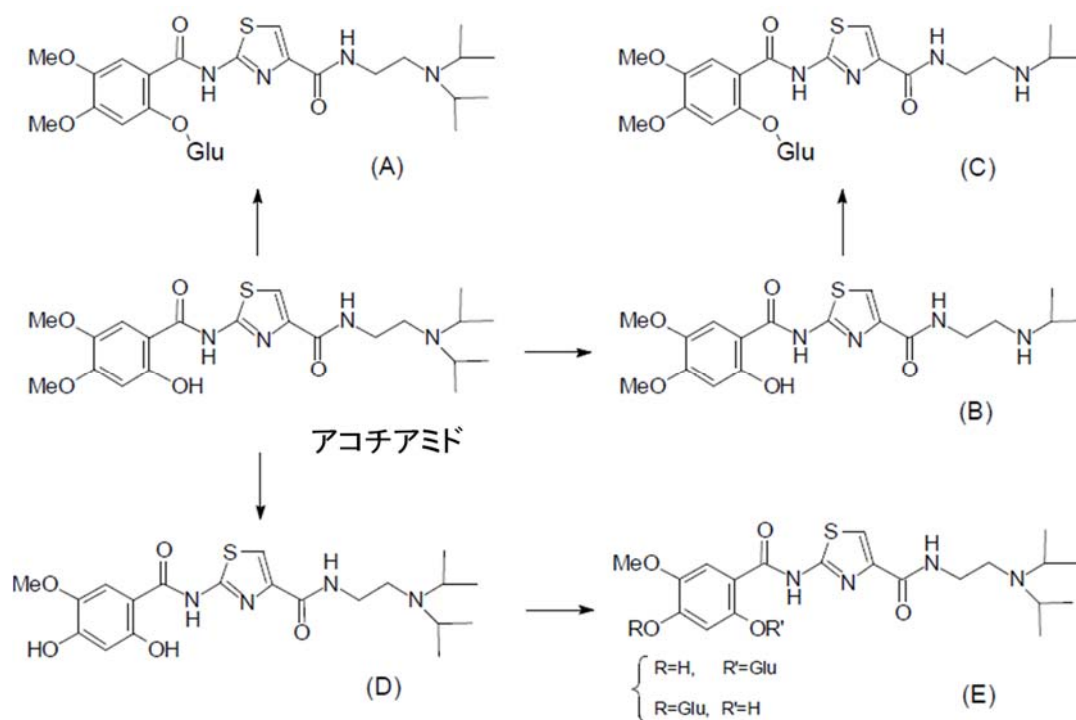


Figure 1-2. Proposed metabolic pathways of Z-338

(A) Z-338 glucuronide (M-1), (B) Deisopropyl metabolite, (C) Glucuronide of deisopropyl metabolite (M-2), (D) Demethyl metabolite, (E) Glucuronide of demethyl metabolite

アコチアミドは胃の筋層間神経叢の神経筋接合部において ACh を分解する AChE を阻害すること、およびアセチルコリン受容体であるムスカリン受容体 M1 および M2 を拮抗することで神経筋接合部のアセチルコリン濃度を上昇させることで、胃の運動機能を促進する。また、ラットに投与速度 2、5、10、20、50 及び 100 nmol/min/kg で定速静脈内投与したとき、胃組織に関する K_p 値 (組織中濃度/血漿中濃度)は、2.4~4.1 mL/g of tissue であったのに対し、骨格筋組織に関する K_p 値はすべての投与速度で約 0.8 mL/g of tissue であった[9]。K_p 値が 1 を上回り、また他の組織より胃組織で高いことから、薬効発現部位である胃組織においてアコチアミドが血液中より選択的・高濃度に分布すると言える。また、胃組織で得られた K_p 値は、血漿中濃度の上昇とともに低下する飽和性が観察されている。一方、骨格筋組織の K_p

値は血漿中濃度に関わらず一定で 1 以下である[12]。従って、アコチアミドの胃組織移行には何らかの選択的移行機構が介在していると推察される。さらに、アコチアミドの体内動態に関する生理学的薬物速度論-薬力学モデル (PBPK/PD モデル) を用いた検討により、胃組織中のアコチアミドが AChE 活性を阻害することで ACh 濃度推移に影響を与えていることが報告されている[13]。

以上の背景から、アコチアミドによる FD 改善作用は、アコチアミドの血中から胃組織中への特異的な移行機構が存在し、それがトランスポーターによると考えられた。そこで本研究においては、アコチアミドの胃組織分布に着目し、アコチアミドの血中から胃組織移行メカニズムを明らかにすることを目的とした。

本論文の第 2 章では、アコチアミドと同様に胃組織を薬効発現部位とするイトプリドを対照として、皮下投与時の胃組織移行性をラットにおいて検討した。経口投与時には、アコチアミドは胃組織管腔に存在するため血中からの組織移行を明確には評価できないため、皮下投与時の薬物動態を検討することとした。第 3 章では、胃組織移行メカニズムを解析するための *in vitro* 試験として、胃癌由来細胞株である Hs 746T 細胞を用いたアコチアミドの細胞内取り込み機構を評価した。さらに、Hs 746T 細胞において担体介在輸送型の取り込みが観測されたため、選択的トランスポーター阻害剤を用い、アコチアミドの細胞内取り込みに関与するトランスポーターを絞り込んだ。第 4 章では、第 3 章で得られた結果をもとに候補となるトランスポーターの過剰発現細胞を使用し、アコチアミド輸送の有無、ならびにその胃組織発現について検討した。

医薬品の薬理効果発現や有害作用発現の決定因子としては、薬理学的要因に加え、薬効発現部位における薬物濃度を規定する薬物動態学的要因が重要となる。近年の医薬品開発では、医薬品候補化合物の消化管吸収の評価が初期段階から行われ、適切な吸収特性を有する化合物が選別されるようになってきている。経口投与後循環血中に到達した薬物は、主に肝臓および腎臓において代謝・排泄により消失する。肝臓や腎臓などのクリアランス臓器では、

異物解毒に関わる種々の薬物代謝酵素や薬物トランスポーターが発現している。代謝酵素やトランスポーターの活性は、併用薬との相互作用や遺伝子多型等様々な要因によって変動するため、薬物代謝酵素及び薬物トランスポーターに関する検討は、医薬品開発において重要である。上記のように、消化管や肝臓でのトランスポーター研究は盛んにおこなわれているが、薬効部位は疾患や薬効標的分子などの発現部位に依存するため、薬効発現部位への移行に関するトランスポーターの関与についての知見は非常に乏しい。本研究では、アコチアミドをモデル化合物として、循環血中から薬効発現部位となる胃組織への輸送機構及び関与する責任トランスポーターについて明らかにすることとを目的とした。

第2章 アコチアミド皮下投与時のラット胃組織移行

第1節 緒言

アコチアミドは臨床投与経路である経口投与でイヌの食後期の胃前庭部運動を亢進させる。この胃前庭部運動の亢進効果は、既存の消化管運動改善薬であるイトプリドと比較し、同程度又はそれ以上の効果を示す[5]。また、アコチアミドはラットの胃前庭部運動も亢進させるとともに、イヌ及びラットの胃前庭部運動低下モデル及びラットの胃排出能低下モデルに対しても改善作用を示す[5,6,7]。

放射性標識体及び非標識体を使用した種々の試験より、アコチアミドは、胃組織に高濃度に分布することが報告されている[12, 13]。また、胃筋層におけるアコチアミド分布をマイクロオートラジオグラフィー法により検討した結果、前胃、胃体部及び幽門前庭部の筋層全域、ならびに神経細胞周辺にも放射能が検出されている。筋層内の特に神経細胞周囲にアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性が認められており、アコチアミド投与時の分布と AChE 活性の分布は、薬理活性発現部位にほぼ一致することが示唆されている[8]。

セロトニン 5-HT₄ 受容体作動薬 (モサプリド) やドパミン D₂ 受容体拮抗薬 (イトプリド) なども消化管運動改善薬として使用されているが、モサプリド及びイトプリドはFDに対して有効性を示した報告がある一方[14,15]、有効性が得られなかった報告[16,17]もある。イトプリドについては、作用部位は胃筋層であると考えられており、オートラジオグラフィー法などにより、血液中から胃筋層への良好な分布が報告されている[18, 19, 20, 21]。

以上より、本章では、アコチアミドが効率的に胃組織に血液中から移行していると仮定し、イトプリドを対照として、皮下投与時のラット胃組織移行性を検討した。経口投与時では胃組織管腔に薬物が存在するため、血中からの胃組織移行を評価するには不適切であることから皮下投与時の薬物動態を検討することとした。

第2節 方法

2-1 試薬

アコチアミドは化学名 N-{2-[bis(1-methylethyl)amino]ethyl}-2-{[(2-hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)carbonyl]amino}-1,3-thiazole-4-carboxamide monohydrochloride trihydrate、化学式 $C_{21}H_{30}N_4O_5S \cdot HCl \cdot 3H_2O$ 、分子量 541.06 の Figure 1-1 に示す構造を有する化合物であり、水に溶けにくい白色～淡黄色の結晶または結晶性の粉末である。アコチアミド 100 mg を秤量し、DMSO 2.5 mL を加えた後、ブドウ糖注射液 47.5 mL を加え、水浴上で加熱して溶解することにより投与液を調製した。なお、アコチアミドは粉末、室温保存で 36 ヶ月の安定性が確認されている。その他の試薬は、特級もしくは分析グレードの製品を用いた。

2-2 実験動物及び飼育環境

- ・ 動物種 ラット
- ・ 系統 Crl:CD (SD)
- ・ 性 雄
- ・ 供給源 日本チャールス・リバー株式会社
- ・ 週齢 使用時 9 週齢
- ・ 飼育施設 動物実験施設 LA160 室
- ・ 収容条件 2~3 匹/ケージ
- ・ ケージ ポリカーボネート製 (W220 × L390 × H180 mm)
- ・ 飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社)
- ・ 飲水 水道水を自由摂取
- ・ 温度 21.2~24.8°C (許容範囲：23 ± 3°C)
- ・ 湿度 44.5~55.6% (許容範囲：55 ± 20%)
- ・ 照明 12 時間/日 (設定：午前 7 時点灯、午後 7 時消灯)

- ・ 馴化期間は1週間以上とし、入荷翌日及び投与前日の絶食前に体重を測定し、一般的健康状態を観察した。

2-3 試験方法

投与試験は $n=6$ で行った。1回の試験につきアコチアミド及びイトプリドの投与量 10 mg/kg の投与後 5、15、30、45 分、1、2、4、6、8 及び 24 時間につきそれぞれラット 1 匹より組織、血液を採取し、合計 20 匹を使用した。群分けは、投与前日に絶食前のラットの体重 (286 g～367 g) を測定し、SAS System Version 8.2 (SAS Institute Inc.) を使用して単変数完全無作為化割付け法により割付けた。約 24 時間絶食したラットに、投与量 10 mg/kg となるように、2 mg/mL の投与液を注射筒 (2.5 mL) 及び注射針 (25G) を用いて 5 mL/kg の割合で背部皮下投与した。投与後 5、15、30、45 分、1、2、4、6、8 及び 24 時間に、血液試料及び胃組織試料を採取した。腹部大動脈よりヘパリンナトリウム注射液で処理した注射筒 (10 mL) 及び注射針 (22 G) で血液を採取した。採取した血液を 2,500×g、10 分間 (4°C) 遠心分離し、血漿試料を分取した。採血後、胃組織として胃体部及び胃前庭部を摘出し、蒸留水で洗浄した。胃組織を液体窒素で凍結し、コンビニエントホモジナイザー (東京理化工機株式会社) で粉砕した。粉砕された胃組織を氷冷したホモジナイザーに移し、重量の 4 倍容の蒸留水を加え、氷冷下、胃組織の切片がなくなるまですりつぶし、胃組織試料とした。血漿試料及び胃組織試料は、内標準物質溶液 (ゼリア新薬工業社内化合物) 10 μ L、メタノール 500 μ L を加え、混和した。除タンパクのために 10,000×g、10 分間 (4°C) 遠心分離し、上清を LC-MS/MS 試料とした。イトプリドの血漿及び胃組織中濃度については、内標準物質溶液 (1 mg/mL エトリコキシブ標準溶液) 10 μ L、3%炭酸ナトリウム溶液 1 mL、*t*-ブチルメチルエーテル:ジクロロメタン (7:3) 混液 4 mL を加え、10 分間、振盪した。500×g、10 分間 (4°C) 遠心分離し、上層を窒素気流下で蒸発乾固した。移動相 150 μ L に再溶解し、HPLC 試料とした。

【アコチアミド LC-MS/MS 条件】

- LC-MS/MS API4000 system
 高速液体クロマトグラフ 1100 series
 ポンプ、デガッサー、オートサンプラー及びカラムオーブン Agilent technologies
 質量分析計 API4000 Applied Biosystems
 解析ソフト Analyst version 1.4.1 Applied Biosystems
- 分析カラム CAPCELL PAK C18 MGII
 (粒子径 5 μm 、内径 4.6 mm、長さ 150 mm)
- ガードカラム Guard cartridge CAPCELL C18 MGII
 (粒子径 5 μm 、内径 2.0 mm、長さ 10 mm)
- カラム温度 50°C
- 移動相 メタノール/20 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH6.0) (6 : 4)
- 流速 800 $\mu\text{L}/\text{min}$
- 注入量 10 μL
- オートサンプラー庫内温度 20°C
- 分析時間 10 分
- イオン化法 ESI positive
- 測定モード MRM
- モニタリングイオン アコチアミド m/z 451 \rightarrow m/z 271
- CAD (コリジョンガス) 5 (単位なし)
- CUR (カーテンガス) 10 psi
- GS1 (ネブライザーガス) 20 psi
- GS2 (ターボガス) 20 psi

- IS (イオンスプレー電圧) 5,000 V
- TEM (ターボガス温度) 500°C
- ihe (インターフェースヒーター) on
- DP (解離電圧) アコチアミド : 50 V、IS : 40 V
- EP (入口電圧) アコチアミド : 15 V、IS : 10 V
- CE (コリジョンエネルギー) アコチアミド : 35 V、IS : 30 V
- CXP (コリジョンセル出口電圧) 10 V

【イトプリド HPLC 条件】

血漿試料の測定では移動相 A を、胃組織試料の測定では移動相 B を使用した。

- HPLC システム Waters Corporation
 ウォータース 2695 セパレーションモジュール
 ウォータース 2475 マルチλ 蛍光検出器
- 分析カラム Inertsil ODS-3 (粒子径 5 μm、内径 4.6 mm、長さ 250 mm)
- 分析カラム温度 30°C
- 移動相 A: 0.05%トリフルオロ酢酸/アセトニトリル (75 : 25)
- 移動相 B: 0.05%トリフルオロ酢酸/アセトニトリル (80 : 20)
- 流速 1 mL/min
- 注入量 75 μL
- 測定時間 35 分
- 測定波長 励起波長 315 nm、蛍光波長 430 nm

2-4 データ解析方法

胃組織移行率を以下の式に従って算出した。

胃組織移行率 (K_p 値) = 胃組織中濃度 (μg/g) / 血漿中濃度 (μg/mL)

血漿及び胃組織における薬物動態パラメータを算出した。薬物動態パラメータの算出には、WinNonlin Professional Ver.5.2 (Pharsight) を用いた。

第3節 結果

ラットへのアコチアミド及びイトプリド皮下投与時の血漿及び胃組織中濃度推移及び胃組織移行率を比較検討した。ラットにアコチアミド又はイトプリド10 mg/kgを皮下投与後、5分から24時間までの血漿及び胃組織中アコチアミド濃度及びイトプリド濃度を測定した。それぞれの被験物質について胃組織移行率及び血漿及び胃組織の薬物動態パラメータを算出した。

ラットにアコチアミド又はイトプリドを10 mg/kgの用量で皮下投与した後の、血漿中濃度及び胃組織中濃度推移をFigure 2-1に、血漿中薬物濃度推移から得られた動態パラメータをTable 2-1に示す。アコチアミドは投与15分後に最高血漿中濃度 $C_{\max,pl}$ 3.65 µg/mLに達した後、半減期 $T_{1/2,pl}$ として1.9時間で消失し、24時間後ではすべての個体の血漿中濃度が定量限界 (1 ng/mL) 以下となった。イトプリドはアコチアミドと同様に投与15分後に最高血漿中濃度 $C_{\max,pl}$ 2.60 µg/mLに達した後、半減期 $T_{1/2,pl}$ 4.2時間で消失した。アコチアミド及びイトプリドの無限大時間までの血漿中濃度曲線下面積 AUC_{pl} はそれぞれ4.14 µg·hour/mL及び9.09 µg·hour/mLとなりイトプリドがアコチアミドよりも約2倍高い値であった。アコチアミド及びイトプリドの平均血漿中滞留時間 MRP_{pl} はそれぞれ0.91時間及び4.0時間となりイトプリドがアコチアミドよりも約4倍長い値であった。

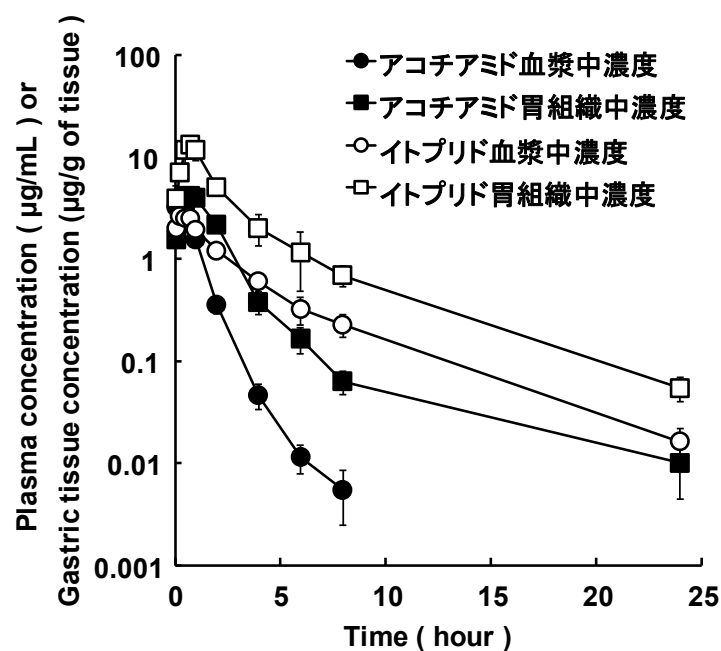


Figure 2-1. Time profiles for the plasma and gastric tissue concentration after subcutaneous administration of acotiamide or itopride at a dose of 10 mg/kg to rats

Concentration of acotiamide and itopride are expressed as free base. Each point represents the mean \pm SD (vertical bars) for six rats except for at 24 hours.

Table 2-1. Plasma pharmacokinetics parameter after subcutaneous administration of acotiamide or itopride at a dose of 10 mg/kg to rats

Parameter	Acotiamide	Itopride
$T_{1/2, pl}$ (hour)	1.9	4.2
$T_{max, pl}$ (hour)	0.25	0.25
$C_{max, pl}$ ($\mu\text{g/mL}$)	3.65	2.60
AUC_{pl} ($\mu\text{g}\cdot\text{hour/mL}$)	4.14	9.09
MRT_{pl} (hour)	0.91	4.0

$T_{1/2, pl}$: Plasma elimination half-life

$T_{max, pl}$: Time to reach the maximal observed plasma concentration

$C_{max, pl}$: Maximum observed plasma concentration

AUC_{pl} : Area under the plasma-concentration time curve extrapolated to infinity

MRT_{pl} : Mean residence time extrapolated to infinity

胃組織中薬物濃度時間推移 (Figure 2-1) から得られた動態パラメータを Table 2-2 に示す。

アコチアミドは投与後 45 分に最高胃組織中濃度 $C_{\max, \text{st}}$ 4.13 $\mu\text{g/g of tissue}$ に達した後、胃組織から半減期 $T_{1/2, \text{st}}$ 6.1 時間で消失した。イトプリドはアコチアミドと同様に投与 45 分後に最高胃組織中濃度 $C_{\max, \text{st}}$ 12.8 $\mu\text{g/g of tissue}$ に達した後、血漿と同程度の半減期 $T_{1/2, \text{st}}$ 4.4 時間で消失した。アコチアミド及びイトプリドの胃組織中濃度曲線下面積 AUC_{st} はそれぞれ 10.4 $\mu\text{g}\cdot\text{hour/g of tissue}$ 及び 35.8 $\mu\text{g}\cdot\text{hour/g of tissue}$ となりイトプリドがアコチアミドよりも高い値であったが、平均胃組織中滞留時間 MRT_{st} はそれぞれ 2.4 時間及び 3.5 時間となりほぼ同程度であった。

Table 2-2. Gastric tissue pharmacokinetics parameter after subcutaneous administration of acotiamide or Itopride at a dose of 10 mg/kg to rats

Parameter	Acotiamide	Itopride
$T_{1/2, \text{st}}$ (hour)	6.1	4.4
$T_{\max, \text{st}}$ (hour)	0.75	0.75
$C_{\max, \text{st}}$ ($\mu\text{g/g of tissue}$)	4.13	12.8
AUC_{st} ($\mu\text{g}\cdot\text{hour/g of tissue}$)	10.4	35.8
MRT_{st} (hour)	2.4	3.5

$T_{1/2, \text{st}}$: Gastric tissue elimination half-life

$T_{\max, \text{st}}$: Time to reach the maximal observed gastric tissue concentration

$C_{\max, \text{st}}$: Maximum observed gastric tissue concentration

AUC_{st} : Area under the gastric tissue-concentration time curve extrapolated to infinity

MRT_{st} : Mean residence time extrapolated to infinity

アコチアミドの胃組織蓄積性 (Kp 値) は、投与後時間の経過とともに上昇し、投与後 6 時間には Kp 値 15 となった (Table 2-3、Figure2-2)。一方、イトプリドの Kp 値も投与後 1 時間までは経時的に上昇し、最高値の Kp 値 6.0 を示したが、投与 2 時間以後は Kp 値 3.3~4.3 で推移した

Table 2-3. Gastric tissue-to-plasma concentration ratio (Kp) after subcutaneous administration of acotiamide or itopride at a dose of 10 mg/kg to rats

Time (hour)	Kp	
	Acotiamide	Itopride
0.083	0.51 ± 0.09	1.9 ± 0.3
0.25	0.93 ± 0.16	2.7 ± 0.6
0.5	1.3 ± 0.4	4.7 ± 1.2
0.75	1.8 ± 0.4	5.4 ± 1.9
1	2.6 ± 0.3	6.0 ± 1.6
2	6.2 ± 1.7	4.3 ± 1.0
4	8.4 ± 2.0	3.4 ± 0.7
6	15 ± 5	3.6 ± 1.4
8	13 ± 4	3.3 ± 1.3
24	NA	3.5 ± 1.7 ¹⁾

Data are expressed as mean ± SD for six rats except point of 24 hours.

NA: not available

1) Data are expressed as mean ± SD for four rats.

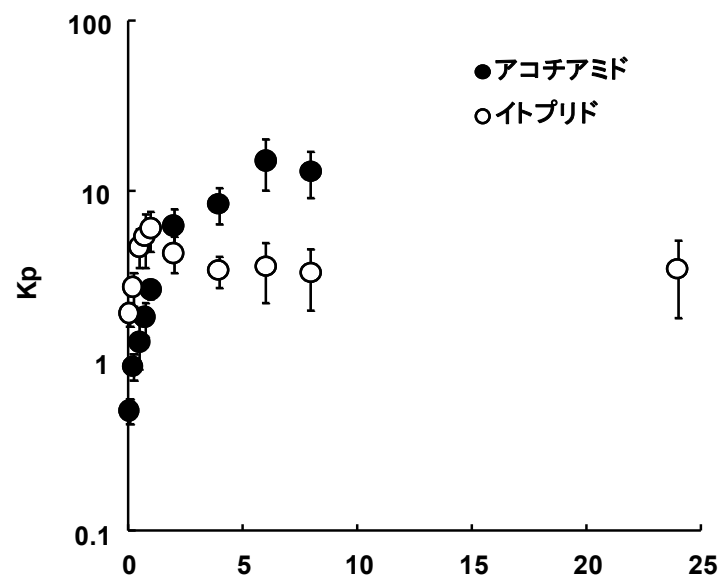


Figure 2-2. Time profiles for Kp value after subcutaneous administration of acotiamide or itopride at a dose of 10 mg/kg to rats

第4節 考察

ラットへのアコチアミド及びイトプリド皮下投与時の血漿及び胃組織中濃度推移及び胃組織移行率を比較検討した。

アコチアミド血漿中濃度推移では、投与後 15 分に最高血漿中濃度 3.65 $\mu\text{g/mL}$ に達した後、半減期 1.9 時間で消失したのに対し、イトプリドは投与後 15 分に最高血漿中濃度 2.60 $\mu\text{g/mL}$ に達した後、半減期 4.2 時間で消失したことから、イトプリドはアコチアミドより消失が遅く、イトプリドはアコチアミドより長く血漿中に維持されることが明らかとなった。一方、胃組織濃度推移では、アコチアミドは投与後 45 分に最高胃組織中濃度 4.13 $\mu\text{g/g of tissue}$ に達した後、胃組織から半減期 6.1 時間で消失したのに対し、イトプリドは投与後 45 分に最高胃組織中濃度 12.8 $\mu\text{g/g of tissue}$ に達した後、血漿と同程度の半減期 4.4 時間で消失した。アコチアミド及びイトプリドの AUC_{st} はそれぞれ 10.4 $\mu\text{g}\cdot\text{hour/g of tissue}$ 及び 35.8 $\mu\text{g}\cdot\text{hour/g of tissue}$ となりイトプリドがアコチアミドよりも高い値であったが、 MRT_{st} はそれぞれ 2.4 時間及び 3.5 時間となりほぼ同程度であった。以上より、胃組織中濃度推移では、投与後 5 分から 24 時間までイトプリドはアコチアミドと比較して高濃度で推移した。

アコチアミドの胃組織移行率 (K_p 値) は、投与後初期では 1 以下であったが時間の経過とともに上昇し、投与後 6 時間後に最大 15 となった。一方、イトプリドは投与直後から血漿中濃度より胃組織中濃度の方が高く、 K_p 値は 2 付近の値を示した。このことからイトプリドはアコチアミドと比較して、血漿から胃組織への移行が早いことが示唆された。また、時間の経過とともに、アコチアミドの K_p 値は上昇したのに対し、イトプリドの K_p 値も経時的に上昇し、アコチアミドより早い投与 1 時間後に最高値に到達し 6.0 を示したが、投与 2 時間後以後の K_p 値は 3.3~4.3 とほぼ一定であった。このことから、アコチアミドは血漿中濃度に対して胃組織中濃度の消失が遅延しており、イトプリドは並行して消失していることが明らかとなった。

以上より、アコチアミドもイトプリドと同様に胃組織移行が高いことが示唆された。しかし、 K_p 値の時間プロファイルの傾向が異なることから胃組織移行の機構は異なる可能性が推察された。アコチアミドとイトプリドでは異なる胃組織移行担体の関与が想定される。アコチアミドに関しては、ラットに定速静脈内投与し、定常状態に達したときの、胃組織血漿非結合型濃度比 ($C_{st,u,cyt}/C_{p,u}$) が 2.8 ± 0.8 mL/g of tissue を示し、胃組織タンパク結合以外にも胃組織分布に受動拡散以外の機構、すなわち担体輸送が関与していることが報告されている[11]。一方、イトプリドに関しては胃組織内のタンパク結合等の情報は報告されていない。また、ラットに投与速度 50 及び 100 nmol/min/kg で定速静脈内投与したとき、胃組織に関する K_p 値 (組織中濃度/血漿中濃度) は 2、5、10、20 nmol/min/kg の投与速度におけ K_p 値より低値を示し、血漿中濃度の上昇に伴い K_p 値の飽和性が報告されている[12]。さらに、骨格筋組織に関する K_p 値は 0.2 以下を示し、胃組織に関する K_p 値よりも低く、血漿中濃度に関わらず一定であることが報告されている[12]。本章での結果とあわせ、アコチアミドの胃組織移行への分布には、特異的な輸送担体が関与する可能性が示唆される。

また、胃筋層におけるアコチアミド分布をマイクロオートラジオグラフィー法により検討では、前胃、胃体部及び幽門前庭部の筋層全域にアコチアミドが分布しており、神経細胞周辺にも放射能が検出されること、筋層内の特に神経細胞周囲にアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性が認められることが報告されている[8]。アコチアミドの体内動態に関する生理学的薬物速度論-薬力学モデル (PBPK/PD モデル) を用いた検討により、胃組織中のアコチアミドが AChE 活性を阻害することで ACh 濃度推移に影響を与えていることも報告されている[13]。以上より、アコチアミドの薬効発現部位である胃に効率良く分布する過程にアコチアミドを基質として認識する輸送担体が関与することが仮説として考えられた。次章以降では、アコチアミド輸送担体の同定を目指し、各種試験を行った。

第3章 培養胃細胞株におけるアコチアミド取り込みの検討

第1節 緒言

第2章で得られたアコチアミド皮下投与時のラット胃組織移行試験、既報のオートラジオグラフ法による試験[8]、ラット定速静脈内投与試験[11]、ならびに PBPK/PD モデルを用いた検討[13]を総合的に考えて、アコチアミドの循環血中から胃組織への移行過程にはトランスポーターが介在しているという仮説を立てた。本章では、アコチアミド取り込み機構の解析に適している *in vitro* 試験系の構築を行った。また、各種トランスポーター阻害剤の影響から胃組織におけるアコチアミド輸送に関与するトランスポーター分子についても探索した。

ヒト消化管研究に汎用されている *in vitro* 試験系として Caco-2 細胞があり、膜透過試験や取り込み試験によって吸収性や膜透過機構の解析に用いられている[22,23]。近年では、ヒト消化管上皮細胞として、induced pluripotent stem cells (iPS) 細胞等の活用も注目されている[24,25,26,27,28]。また、消化管吸収における部位差について検討する際には、ラット *in situ* closed loop 法など多様な方法が用いられる[29]。しかし、血中から胃組織への薬物移行の解析研究手法として報告されている試験系はない。

アコチアミドの取り込み活性が維持されトランスポーター機能が十分に観察できる試験系であれば、アコチアミド輸送に関与する分子探索のためのトランスポーター阻害試験の実施が可能になる。そこで、数種の胃培養細胞株 (Hs 746T 細胞[30]、SNU-5 細胞[31]及び NCI-N87 細胞[31]) におけるアコチアミドの取り込み機能について予備検討を行うこととした。その結果、SNU-5 細胞及び NCI-N87 細胞においては顕著なアコチアミド取り込み活性を示しておらず、アコチアミド取り込み機能の検討には Hs 746T 細胞が適していると判断した。本章では、Hs 746T 細胞を胃のモデル細胞として使用し、アコチアミド取り込みの機能解析を実施した。

2-1 試薬

CC(C)N(CC)CCNC(=O)c1csc(C(=O)Nc2cc(OC)c(OC)c(O)c2)c1.Cl

Figure 3-1. Chemical structure of acotiamide

Hs 746T 細胞は American Type Culture Collection (Rockville, VA) から入手した。Hs 746T 細胞は、4.5 g/L の glucose を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Life technologies) に 10% Fetal bovine serum (FBS, GIBCO) , 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin / 100 µg/mL streptomycin (和光純薬株式会社) を加えた培地で培養した。37°C、5% CO₂ 条件下で培養し、その間、適宜培地交換を実施した。取り込み試験時には、細胞播種後 4-5 日間培養した後に使用した。

Transport buffer (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 5.6 mM D-glucose, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, and 25 mM HEPES, pH 7.4) を用いて 4.0×10^6 cells/mL に調製した細胞懸濁液を 37°C の恒温槽で 10 分間プレインキュベーションし、放射能標識された各基質溶液を添加することで取り込み反応を開始した。取り込み反応の停止はシリコンオイルレイヤー法

[32,33,34,35]で実施した。細胞懸濁液 50 μ L に氷冷した Transport buffer 150 μ L を混和し、その細胞懸濁液 50 μ L を 2 N NaOH (50 μ L) に混合オイル (密度: 1.005 g/mL、シリコンオイルとミネラルオイル混液) を 100 μ L 重層した微量サンプリングチューブに移し、すぐに卓上遠心器 (MiniSpin, Eppendorf Co) で 45 秒遠心分離 (14000 \times g) することにより細胞と薬液を分離し、取り込み反応を停止した。遠心分離後、細胞が溶解するまで、遠心用チューブを室温で放置した後、遠心用チューブを切断して、下層 (細胞) と緩衝液 (上層) を液体シンチレーションに移した。バイアルに 5 mL の液体シンチレーションカクテル (Ultima Gold XR, PerkinElmer, Boston, MA) を加え、よく混合した後に放射能を液体シンチレーションカウンタ (Tri-Carb 3110 Liquid Scintillation Counter, PerkinElmer, Boston, MA) で測定した。また、取り込み反応に使用した細胞懸濁液の一部はタンパク定量に供した。

2-4 タンパク定量

細胞のタンパク量を定量するために、Bradford 法に基づくキット (Bio-Rad, Richmond, CA) を用いて測定した。詳細は、製品マニュアルに従ったが、以下に手順を記載する。標準溶液として、bovine serum albumin を用いた。定量範囲は、50~200 μ g/mL とした。適宜、蒸留水で希釈した細胞懸濁液 1000 μ L に、Bio-Rad Protein Assay 液を 200 μ L 加え、10 分後に 595 nm の吸光度を測定した。

2-5 データ解析方法

取り込み(Uptake) 活性は、規定の時間における培養細胞中の放射能、あるいはその値を transport buffer 中の初期放射能濃度除した Cell/Medium 比 (C/M Ratio) を蛋白量で除したタンパク量あたりに規格化して算出した。

取り込み活性の速度論パラメータは取り込みに直線性の成り立つ時間を選択し、その時間における取り込み速度を測定し、以下の式に従って算出した。

$$v_0 = V_{\max} \cdot S / (K_m + S) + P_{\text{dif}} \cdot S$$

ここで v_0 は取り込みの初速度 (pmol/min/mg protein) 、 V_{\max} は最大取り込み速度 (pmol/min/mg protein) 、 K_m は Michaelis-Menten 定数 (μM)、 P_{dif} は非特異的取り込みクリアランス ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$) 、 S は transport buffer 中のアコチアミド濃度 (μM) を示す。 K_m 、 V_{\max} 、 P_{dif} は Phoenix WinNonlin Ver.6.4 (Certara, St. Louis, MO) を用いて、非線形最小二乗法によりあてはめ計算を行い求めた。

アコチアミド取り込みに対する fluvoxamine の阻害定数 (K_i) は、競合阻害を仮定し、阻害剤濃度 I のときの活性残存率と以下の式より Phoenix WinNonlin Ver.6.4 (Certara, St. Louis, MO)を用いて、非線形最小二乗法によりあてはめ計算を行い求めた。

$$v_0 = V_{\max} \cdot S / [K_m \cdot (1 + I/K_i) + S] + P_{\text{dif}} \cdot S$$

2-6 統計解析

統計的有意差の検定は、Student の t-test により実施し、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

第3節 結果

3-1 Hs 746T 細胞へのアコチアミド取り込みの時間依存性

Hs 746T 細胞へのアコチアミドの時間依存的な取り込みを検討した結果を Figure 3-2 に示す。アコチアミドの細胞内への取り込み量は、37°C の条件下において時間とともに増加した。また、細胞内への取り込み量は、4°C 条件下では時間に伴う増大は見られず、また、37°C の条件下においてより高い取込みであった。

Hs 746T 細胞における 37°C 条件下でのアコチアミドの取り込みは、反応時間 3 分までは直線的な増加がみられたため、以降の速度論的解析では、0.5 分から 3 分における取り込み量から取り込み初速度を求め評価した。

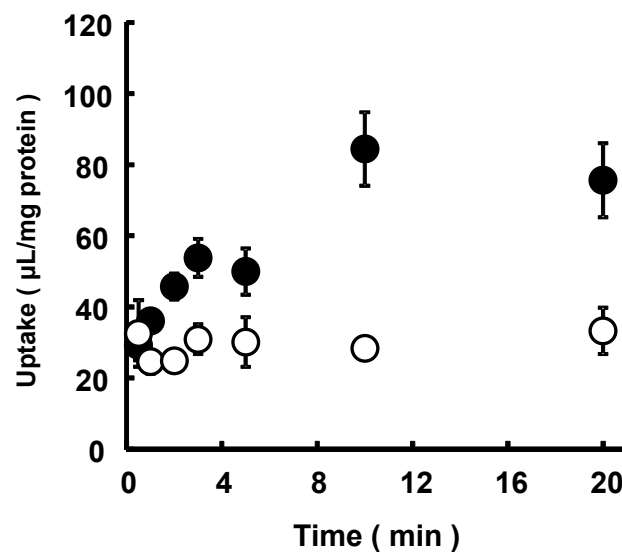


Figure 3-2. Time course of acotiamide uptake (5 μM).

Open and closed circles represent the uptake of acotiamide at 4°C and 37°C, respectively. Each point and vertical bar represents the mean \pm S.E. for four experiments.

3-2 Hs 746T 細胞へのアコチアミド取り込みの濃度依存性

Hs 746T 細胞へのアコチアミド濃度を 5 μM から 800 μM まで変えたときの取り込み初速度を検討した結果を Figure 3-3 に示す。Hs 746T 細胞において、アコチアミドの取り込みは、1 つの飽和性コンポーネントと非飽和性コンポーネントの和によって解析された。 K_m 、 V_{\max} 、および P_{dif} は、それぞれ 106 μM 、1.28 nmol/min/mg protein、および 2.06 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ と算出された。Eadie-Hofstee plot から同様に 1 つの飽和性コンポーネントと 1 つの非飽和性コンポーネントから成ることを支持する結果が得られた。

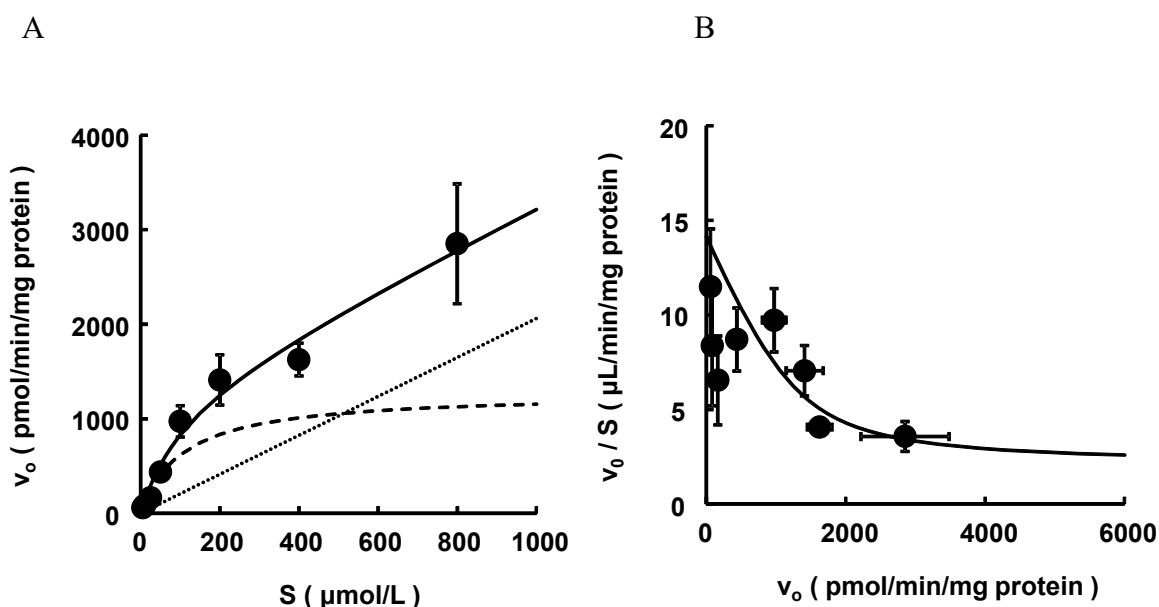


Figure 3-3. Concentration dependence of acotiamide uptake by Hs 746T cells.

Each point and vertical bar represents the mean \pm S.E. for four experiments. (A) The solid line shows the total uptake. The dotted line represents nonsaturable component calculated using the value for non-specific uptake clearance (P_{dif}). Carrier-mediated uptake (dashed line) was calculated by subtracting nonspecific diffusion from total uptake and indicates saturable uptake. (B) The uptake of acotiamide at various concentrations is shown in an Eadie-Hofstee plot. The solid line represents the calculated values using kinetic parameters obtained by nonlinear least-squares analysis. The data were first fitted to equation $[v_0 = V_{\max} \cdot S / (K_m + S) + P_{\text{dif}} \cdot S]$ and the fitted line was subsequently converted to v_0/S vs. v_0 form.

3-3 Hs 746T 細胞へのアコチアミド取り込みにおける駆動力の検討

Hs 746T 細胞におけるアコチアミド取り込みにおける pH 依存性及び Na⁺依存性を検討した結果を Figure 3-4 に示す。pH 依存性については、Transport buffer の pH を 6.2～8.0 の範囲で変化させ、取り込み初速度を測定した。Na⁺依存性については、Transport buffer 中の Na⁺を NMG⁺、Li⁺または choline と置換し、取り込み初速度を測定した。いずれの条件においても、取り込み初速度への影響は検出されなかった。

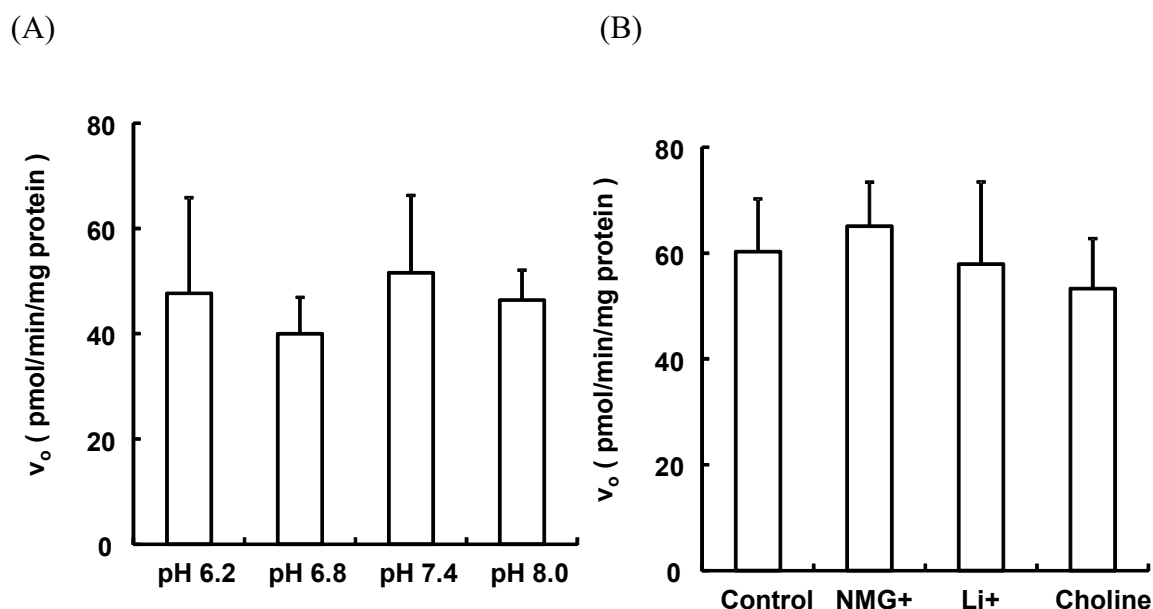


Figure 3-4. Effects of pH and Na⁺ on acotiamide uptake by Hs 746T cells.

(A) Initial uptake rate of acotiamide (5 μ M) by Hs 746T cells was measured at various pH of transport buffer in the range from 6.2 to 8.0. (B) Na⁺ was substituted by replacing with NMG⁺, Li⁺ or choline. Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E. for four experiments.

3-4 アコチアミド取り込みに対するトランスポーター阻害剤の検討

Hs 746T 細胞へのアコチアミド取り込みに対する各種トランスポーターに対する阻害剤の影響を検討した結果を Table 3-1 に示す。なお、対象トランスポーターとしたのは、低分子化合物を基質または阻害剤として認識することが報告されているトランスポーターを選定した。使用した阻害剤濃度は報告されている IC_{50} 値、 K_i 値又は K_m 値を上回る濃度で設定した。 IC_{50} 値、 K_i 値又は K_m 値の報告がない阻害剤については、試験系全体で有機溶媒濃度が 1%を超えない範囲で最大限濃い濃度を設定した。

アコチアミド取り込みは、fluvoxamine、sertraline、fluoxetine 存在下において、それぞれ 38.8%、11.7%、27.2%と有意に低下した。Serotonin 存在下においては、54.5%と低下傾向を示した。

Table 3-1. Inhibitory effects of various compounds on the uptake of acotiamide by Hs 746 T

cells.

Compound	Transporter	Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	Percent of control (%)
Acetyl CoA	ACATN1	50	84.2 \pm 21.1
Alanine	ASCT2	1000	87.9 \pm 10.6
Arginine	CAT-1	1000	104.7 \pm 14.6
BCH	LATs	500	124.5 \pm 15.3
Betaine	GATs	500	100.8 \pm 19.7
BSP	NTCP, OATPs	1000	95.8 \pm 10.2
Bupropion	NET, DAT and SERT	1000	46.2 \pm 14.4*
Choline	CTLs	1000	83.4 \pm 8.0
Creatine	CT1, 2	500	81.5 \pm 20.1
Evans Blue	VGLUT	50	47.6 \pm 18.7*
Fluoxetine	NET, DAT and SERT	1000	27.2 \pm 8.2*
Fluvoxamine	NET, DAT and SERT	1000	38.8 \pm 4.2*
GABA	GAT, BGT1	500	103.8 \pm 11.3
Glutamine	ASCT2	1000	85.1 \pm 9.3
Glycine	GLYT	1000	94.2 \pm 11.1
Glycylsarcosine	PEPTs	500	81.9 \pm 23.2
Hemicholinium-3	ChT	100	76.0 \pm 17.1
L-ascorbic acid	SVCT	500	83.0 \pm 10.9
L-Carnitine	OCTNs, ATB0+	500	127.8 \pm 30.9
L-Glutamate	EAAT	50	153.4 \pm 18.2
L-lactate	SMCT1	1000	124.6 \pm 18.0
Methotrexate	RFT	500	131.5 \pm 15.8
NBMPR	ENTs	500	135.0 \pm 34.6
Nefazodone	NET, DAT and SERT	100	63.5 \pm 21.8
Nipecotic acid	GAT, BGT1	500	85.2 \pm 17.9
Norepinephrine	NET, DAT and SERT	1000	72.0 \pm 25.0
Proline	PROT	500	103.2 \pm 16.8
Pyruvate	MCTs	500	158.5 \pm 29.2
Reserpine	VMAT	10	84.8 \pm 8.8
Serotonin	NET, DAT and SERT	1000	54.5 \pm 12.1
Sertraline	NET, DAT and SERT	1000	11.7 \pm 8.7*
Taurine	TAUT	500	92.0 \pm 29.0
Thiamine	ThTr	500	102.9 \pm 22.1
Trans-2,4-PDC	EAATs	50	93.4 \pm 16.9
Trazodone	NET, DAT and SERT	1000	59.5 \pm 15.4*
Vesamicol	VACHT	50	128.2 \pm 15.5

The results are shown as a percentage of control uptake. Data represent the mean \pm S.E. for five experiments. *P < 0.05

3-5 アコチアミド取り込みに対する fluvoxamine の濃度依存的阻害の検討

3-4 で阻害効果を示した fluvoxamine について、非特異的な阻害効果の可能性を排除するため、Hs 746T 細胞へのアコチアミド取り込みに対する fluvoxamine の濃度依存的な阻害の影響を検討した (Figure 3-5)。アコチアミド取り込みに対して、fluvoxamine は濃度依存的な阻害を示し、競合阻害を仮定した際の K_i 値は $257 \mu\text{M}$ であった。

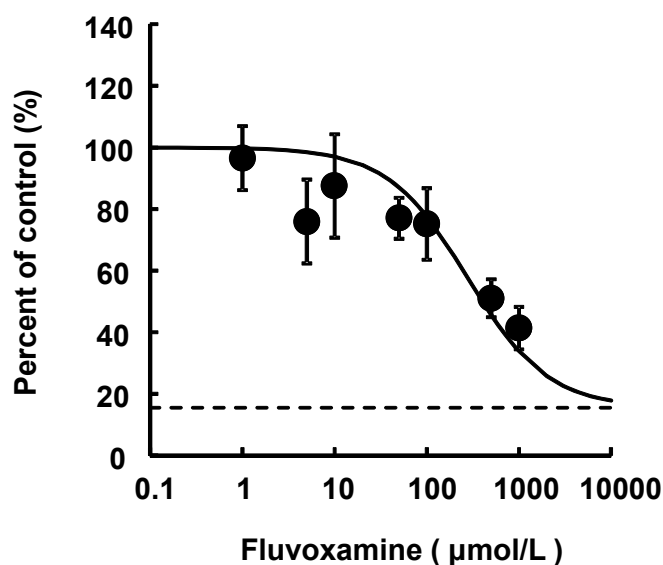


Figure 3-5. Inhibitory kinetics of fluvoxamine on the uptake of acotiamide by Hs 746 T cells. Each point and vertical bar represents the mean \pm S.E. for four experiments. The solid line shows the inhibitory curve obtained by WinNonlin Professional Ver.6.4 (Pharsight). The dashed line represents nonsaturable diffusion calculated by the value for non-specific uptake clearance (P_{dif}).

第4節 考察

本章では、アコチアミド取り込みの機能解析に適している *in vitro* 試験系として、Hs 746T 細胞におけるアコチアミド取り込み試験系の構築を行った。また、各種トランスポーター阻害剤の影響を検討し、胃組織におけるアコチアミド輸送に関与するトランスポーター分子の候補についても探索した。

Hs 746T 細胞におけるアコチアミド取り込みには、飽和性が見られ、その K_m は $106\ \mu\text{M}$ と見積もられた。非飽和性のコンポーネントについては、拡散ならびに細胞膜や容器への非特異的な吸着が影響していると考察される。さらに、Hs 746T 細胞におけるアコチアミド取り込みは温度依存的であり、 4°C では時間依存的な取り込み量の増大がなかったことから、Hs 746T 細胞によるアコチアミド取り込にはトランスポーターが関与していると考えられ、トランスポーター分子の探索系として選択した。

トランスポーターの特性として、駆動力がある。そこで、Hs 746T 細胞へのアコチアミド取り込みについて、輸送駆動力の観点から特徴づけることを試みた。しかし、pH 依存性や Na^+ 依存性は検出されなかったため、駆動力については明らかにできなかった。よって、駆動力の観点からトランスポーターの絞り込みは行えなかった。

続いて、アコチアミド輸送分子候補の絞り込みのために、アコチアミドの取り込みに対する各種トランスポーター阻害剤の影響を検討した。本試験においては基質となるアコチアミド濃度は $8.2\ \mu\text{M}$ とした。この濃度において、Hs 746T 細胞へのアコチアミド取り込み $\text{total uptake} (V_{\max} \cdot S / (K_m + S) + P_{\text{dif}} \cdot S)$ に対する飽和性の取り込みの寄与 ($V_{\max} \cdot S / (K_m + S)$) は 85% であり、阻害効果を十分に検出できると判断した。使用した阻害剤の一覧を Table 3-2 に示した。阻害剤については、トランスポーター基質及び阻害剤として報告されている化合物を選択し、報告されている K_m 値や IC_{50} 値、 K_i 値を参考に、試験濃度を設定した。

Table 3-2. Chemical inhibitors of transporter isoforms.

Compound	Transporter	Reported value	References
Acetyl CoA	ACATN1	-	36
Alanine	ASCT2	K_m : ~20 $\mu\text{mol/L}$	37
Arginine	CAT-1	K_m : 125 $\mu\text{mol/L}$	38
BCH	LATs	LAT-1 K_i : 132 μM	39,40
Betaine	GATs	-	41
BSP	NTCP, OATPs	OATP1B1 K_i : 0.6 $\mu\text{mol/L}$ OATP1B3 K_d : 1 $\mu\text{mol/L}$	42,43,44
Bupropion	NET, DAT and SERT	NET K_i : 1.4 $\mu\text{mol/L}$ DAT K_d : 2.8 $\mu\text{mol/L}$ SERT K_i : 45 $\mu\text{mol/L}$	45
Choline	CTLs	CTL1 K_m : 10-50 $\mu\text{mol/L}$ CTL1 K_m : 50-200 $\mu\text{mol/L}$	46
Creatine	CT1, 2	-	47
Evans Blue	VGLUT	K_i : 87 nmol/L	48,49
Fluoxetine	NET, DAT and SERT	NET K_i : 0.574 $\mu\text{mol/L}$ DAT K_d : 5.96 $\mu\text{mol/L}$ SERT K_i : 5.7 nmol/L	50
Fluvoxamine	NET, DAT and SERT	NET K_i : 1.119 $\mu\text{mol/L}$ DAT K_d : 32.24 $\mu\text{mol/L}$ SERT K_i : 1.1 nmol/L	50
GABA	GAT, BGT1	IC_{50} : 5 $\mu\text{mol/L}$	51
Glutamine	ASCT2	K_m : 23.8 $\mu\text{mol/L}$	37

Glycine	GLYT	K _m : 17 µmol/L	52
Glycylsarcosine	PEPTs	K _m : 290 µmol/L	53
Hemicholinium-3	ChT	-	46
L-ascorbic acid	SVCT	K _m : 107 µmol/L	54
L-Carnitine	OCTNs, ATB0+	K _m : 10.9 µmol/L	55,56,57
L-Glutamate	EAAT	K _m : 62 µmol/L	58
L-lactate	SMCT1	K _m : 81 µmol/L	59
Methotrexate	RFT	-	60
NBMPR	ENTs	K _i : 2 nmol/L	61
Nefazodone	NET, DAT and SERT	NET K _i : 0.713 µmol/L DAT K _d : 0.36 µmol/L SERT K _i : 0.549 µmol/L	62,63
Nipecotic acid	GAT, BGT1	GAT1 IC ₅₀ : 8 µmol/L GAT2 IC ₅₀ : 38 µmol/L GAT3 IC ₅₀ : 106 µmol/L BGT1 IC ₅₀ : 2370 µmol/L	51
Norepinephrine	NET, DAT and SERT	NET K _m : 0.789 µmol/L DAT K _m : 17 µmol/L	64,65
Proline	PROT	K _m : 20.6 µmol/L	66
Pyruvate	MCTs	-	67
Reserpine	VMAT	-	68
Serotonin	NET, DAT and SERT	SERT K _m : 0.398 µmol/L	64
Sertraline	NET, DAT and SERT	NET K _i : 0.963 µmol/L DAT K _i : 0.315 µmol/L	50

		SERT K _i : 2.8 nmol/L	
Taurine	TAUT	K _m : 3.4 μmol/L	69
Thiamine	ThTr	ThTr 1 K _m : 2.5 μmol/L	70
Trans-2,4-PDC	EAATs	-	71,72,73
Trazodone	NET, DAT and SERT	NET K _i : 30.8 μmol/L DAT K _d : 7.4 μmol/L SERT K _i : 70.1 μmol/L	62, 63
Vesamicol	VACHT	IC ₅₀ : 14.7 nM	74

阻害試験の結果、fluvoxamine、sertraline、fluoxetine 及び serotonin などの選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRIs) に共通してアコチアミド取り込みを低下させる結果が得られた。Fluvoxamine については濃度を変えて阻害試験も行ったところ、アコチアミド取り込みに対して濃度依存的な阻害作用が検出された (K_i 値: 257 μM)。以上より、SSRIs によって阻害されるトランスポーターがアコチアミド取り込みに関与することが示唆された。SSRIs によって阻害されることが報告されているトランスポーターは Table 3-2 に記載した SERT、DAT、NET 以外にも PMAT[75]、OCT1[76]、OCT3[77]、VMAT[78]などが報告されており、いずれかの特定が必要となる。

本章では、Hs 746T 細胞を胃のモデル細胞として使用し、アコチアミド取り込み特性の解析、ならびに関与するトランスポーターの絞り込みを行った。その結果、胃組織へのアコチアミド取り込みに、SERT、DAT、NET、PMAT、OCT1、OCT3 など SSRI を輸送するトランスポーターの関与を示唆する結果を得た。次章においては、候補トランスポーター分子の可能性をさらに調べることとした。

第4章 トランスポーター発現細胞を用いたアコチアミド取り込みの検討

第1節 緒言

第3章において、SERT、DAT、NET、PMAT、OCT1、OCT3などのトランスポーター分子がアコチアミドの胃組織取り込みに関与する可能性を示唆する結果を得た。そこで本章では、それらの関与について各分子の発現細胞を用いて詳細な検討を行うこととした。対象としたトランスポーター分子は、上記のトランスポーターに加え、薬物輸送にも働くことが明確な OATP1B1[79,80]、OATP1B3[79]、OATP2B1[81,82]、OAT1[83,84]、OAT3[83,84]、MATE1[85]、MATE2-K[85]についても、過剰発現細胞を用いた検討を実施した。

医薬品開発においては、安全性評価の一環としてトランスポーターを介した薬物相互作用 (Drug-Drug Interaction; DDI) について、その特徴と程度を *in vitro* 実験系ならびに必要に応じて臨床試験により評価する。上記の薬物トランスポーターの基質となった際には、各トランスポーター阻害薬との併用投与で、意図しない薬物の血中濃度および組織中濃度の変動も懸念される。したがって、薬効標的組織である胃組織移行に関与するトランスポーター探索と同時に、複数のトランスポーター分子の評価を本章では実施した。なお、アコチアミドは、DDIの問題が多い薬物代謝酵素である CYP 分子種上での DDI の可能性は低いことが既に *in vitro* 試験により報告されている[10]。主代謝物はグルクロン酸抱合体であり、UGT1A8 及び UGT1A9 により代謝されるが、UGT は臨床において薬物相互作用に関する報告が少ない代謝酵素であり、2 つの UGT 分子種で代謝されることから、どちらか一方の UGT が阻害されたとしても、グルクロン酸抱合体への代謝が完全に阻害されることはなく、血漿中濃度の変動は起こりにくい。以上の理由により本研究では薬物代謝酵素については検討を行っていない。

また、本章ではアコチアミドを基質とするトランスポーターとして PMAT が示唆されたため、ヒト胃組織を用いた発現局在の検討も行った。

第2節 方法

2-1 試薬

[¹⁴C]アコチアミド (2.26 GBq/mmol) は GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK)で合成されたものを使用した。[¹⁴C]アコチアミドの標識位置を Figure 3-1 に示した。SERT 発現ベクター、DAT 発現ベクター、NET 発現ベクターは OriGene Technologies (Rockville, MD) から購入した。PMAT 発現ベクター (pFN21A HaloTag CMV Flexi Vector) は Promega (Madison, WI). から購入した。抗ヒト PMAT ヤギポリクローナル抗体 (sc-164272) は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) より購入した。胃組織凍結切片スライドは Biochain Institute, Inc. (Hayward, CA) より購入した。その他の試薬は、特級もしくは分析グレードの製品を用いた。

2-2 細胞の培養

HEK293 細胞、CHO 細胞及び MDCKII 細胞は American Type Culture Collection (Rockville, VA) から入手した。HEK293FT 細胞は American Type Culture Collection (ThermoFisher Scientific) から入手した。トランスポーター安定発現細胞 (OCT1 安定発現 CHO 細胞、OCT2 安定発現 CHO 細胞、OATP1B1 安定発現 CHO 細胞、OATP1B3 安定発現 CHO 細胞、OATP1B3 安定発現 MDCKII 細胞、OAT1 安定発現 CHO 細胞、OAT3 安定発現 HEK293 細胞、MATE1 安定発現 MDCKII 細胞、MATE2-K 安定発現 MDCKII 細胞) は SOLVO Biotechnology (Hungary) より入手した。

HEK293 細胞、HEK293FT 細胞及び MDCKII 細胞は、4.5 g/L の glucose を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Life technologies) に 10% Fetal bovine serum (FBS, GIBCO) 、2 mM glutamine、100 U/mL penicillin / 100 µg/mL streptomycin (和光純薬株式会社) 、1×non-essential amino acid (ThermoFisher Scientific) を加えた培地で培養した。

CHO 細胞は、4.5 g/L の glucose を含む Dulbecco's modified Eagle medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12, Life technologies) に 10% Fetal bovine serum (FBS, GIBCO) 、2 mM glutamine,

100 U/mL penicillin / 100 µg/mL streptomycin (和光純薬株式会社) を加えた培地で培養した。

トランスポーター安定発現細胞は親細胞と同様の培地で培養した。37°C、5% CO₂ 条件下で培養し、その間、適宜培地交換を実施した。

2-3 SERT、DAT、および NET 一過性過剰発現細胞における取り込み試験

HEK293 細胞をプレートに播種し、24 時間培養した後に、リン酸カルシウム法 (CalPhos Mammalian Transfection Kit, Clontech) [86,87]により、SERT、DAT 又は NET 遺伝子のトランスフェクションを行い、2 日間培養した後に、取り込み試験を行った。Transport buffer (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 5.6 mM D-glucose, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, and 25 mM HEPES, pH 7.4) を用いて 1.0×10^6 cells/mL に調製した細胞懸濁液を 37°C の恒温槽で 10 分間プレインキュベーションし、放射能標識された各基質溶液を添加することで取り込み反応を開始した。インキュベーション後、反応の停止はシリコンオイルレイヤー法 [32,33,34,35]で実施した。細胞懸濁液 50 µL に氷冷した Transport buffer 150 µL を混和し、その細胞懸濁液 50 µL を 2 N NaOH (50 µL) に混合オイル (密度: 1.005 g/mL、シリコンオイルとミネラルオイル混液) を 100 µL 重層した微量サンプリングチューブに移し、すぐに卓上遠心器 (MiniSpin, Eppendorf Co) で 45 秒遠心分離 ($14000 \times g$) することにより細胞と薬液を分離し、取り込み反応を停止した。遠心分離後、細胞が溶解するまで、遠心用チューブを室温で放置した後、遠心用チューブを切断して、下層 (細胞) と緩衝液 (上層) を液体シンチレーションに移した。バイアルに 5 mL の液体シンチレーションカクテル (Ultima Gold XR, PerkinElmer, Boston, MA) を加え、よく混合した後に放射能を液体シンチレーションカウンタ (Tri-Carb 3110 Liquid Scintillation Counter, PerkinElmer, Boston, MA) で測定した。また、取り込み反応に使用した細胞懸濁液の一部はタンパク定量用に供した。

取り込み試験実施時には、各トランスポーターの代表的基質をあわせて評価し、陽性対照とした。

2-4 トランスポーター安定発現細胞 (OCT1-CHO 細胞、OCT2-CHO 細胞、OATP1B1-CHO

細胞、OATP1B3-CHO 細胞、OATP1B3-MDCKII 細胞、OAT1-CHO 細胞、OAT3-HEK293 細胞、MATE1-MDCKII 細胞、MATE2-K-MDCKII 細胞)における取り込み試験

各培養細胞について、細胞濃度 2.0×10^5 cells/well で 24-well plate に播種し、3～4 日培養後、取り込み試験に用いた。培養したプレートから培地を吸引し、37°C の Transport buffer (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 5.6 mM D-glucose, 1.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , and 25 mM HEPES, pH 7.4、MATE1 安定発現 MDCKII 細胞、MATE2-K 安定発現 MDCKII 細胞においては、pH 8.0 に調整した Transport buffer を使用) 300 μL に置換し、5 分間インキュベーションした。Transport buffer を吸引し、300 μL の標識体を含む transport buffer を添加して反応を開始した。規定の時間経過後に Transport buffer を吸引し、氷冷した 300 μL の Transport buffer で細胞を 2 回洗浄した。1 M NaOH 300 μL で細胞を溶解し、1 N HCl 300 μL で中和した。液体シンチレーションカクテル (OptiPhase Supermix scintillation cocktail, PerkinElmer, Boston, MA) を加え、よく混合した後に放射活性を液体シンチレーションカウンタ (MicroBeta2 liquid scintillation counter, PerkinElmer, Boston, MA) で測定した。取り込み反応に使用した細胞懸濁液の一部はタンパク定量用に供した。

取り込み試験実施時には、各トランスポーターの既知基質をあわせて評価し、陽性対照とした。

2-5 OCT3 一過性過剰発現細胞における取り込み試験

HEK293-FT 細胞を細胞濃度 2.0×10^5 cells/well で 24-well plate に播種し、24 時間培養した後に、リポフェクション法 (Lipofectamine 2000, Invitrogen) より、OCT3 遺伝子のトランスフェクションを行い、1 日間培養した後に、取り込み試験を行った。培養したプレートから培地を吸引し、37°C の Transport buffer (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 5.6 mM D-glucose, 1.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , and 25 mM HEPES, pH 7.4) 300 μL に置換し、5 分間インキュベーションした。Transport buffer を吸引し、300 μL の標識体を含む Transport buffer を添加して反応を開始した。規定の時間経過後に Transport buffer を吸引し、氷冷した 300 μL

の Ttransport buffer で細胞を 2 回洗浄した。1 M NaOH 300 μ L で細胞を溶解し、1 N HCl 300 μ L で中和した。細胞溶解液に液体シンチレーションカクテル (OptiPhase Supermix scintillation cocktail, PerkinElmer, Boston, MA) を加え、よく混合した後に放射活性を液体シンチレーションカウンター (MicroBeta2 liquid scintillation counter, PerkinElmer, Boston, MA) で測定した。取り込み反応に使用した細胞懸濁液の一部はタンパク定量用に供した。

取り込み試験実施時には、各トランスポーターの代表的基質をあわせて評価し、陽性対照とした。

2-6 PMAT 一過性過剰発現細胞における取り込み試験

HEK293 細胞を細胞濃度 2.0×10^5 cells/well で 24-well plate に播種し、4 時間培養した後に、リン酸カルシウム法 (CalPhos Mammalian Transfection Kit, Clontech) [86,87]により、PMAT 遺伝子のトランスフェクションを行った。トランスフェクションの際の発現ベクター使用量は 0.5 μ g/well で行った。1 日後、細胞培地を 5 mM 酪酸ナトリウム存在下の細胞培地に置換し、更に 1 日間培養した後に、取り込み試験を行った。培養したプレートから培地を吸引し、37°C の Transport buffer (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 5.6 mM D-glucose, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, and 25 mM HEPES, pH 7.4) 250 μ L に置換し、5 分間インキュベーションした。Transport buffer を吸引し、250 μ L の標識体を含む Transport buffer を添加して反応を開始した。規定の時間経過後に Transport buffer を吸引し、氷冷した 500 μ L の Ttransport buffer で細胞を 2 回洗浄した。細胞溶解液 M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Fisher Scientific) 400 μ L で細胞を溶解した。細胞溶解液に液体シンチレーションカクテル (Ultima Gold XR, PerkinElmer, Boston, MA) を加え、よく混合した後に放射能を液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 3110 Liquid Scintillation Counter, PerkinElmer, Boston, MA) で測定した。取り込み反応に使用した細胞懸濁液の一部はタンパク定量用に供した。

取り込み試験実施時には、各トランスポーターの既知基質をあわせて評価し、陽性対照とした。

2-7 タンパク定量

細胞のタンパク量を定量するために、Bradford 法に基づくキット(Bio-Rad, Richmond, CA)を用いて測定した。詳細は、製品マニュアルに従ったが、以下に手順を記載する。標準溶液として、bovine serum albumin を用いた。定量範囲は、50～200 µg/mL とした。適宜、蒸留水で希釈した細胞懸濁液 1000 µL に、Bio-Rad Protein Assay 液を 200 µL 加え、10 分後に 595 nm の吸光度を測定した。

2-8 データ解析方法

取り込み(Uptake) 活性は、規定の時間における培養細胞中の放射能、あるいはその値を transport buffer 中の初期放射能濃度除した Cell/Medium 比 (C/M Ratio) を、蛋白量で除したタンパク量あたりに規格化して算出した。

取り込み活性の速度論パラメータは取り込みに直線性の成り立つ時間を選択し、その時間における取り込み速度を測定し、以下の式に従って算出した。

$$v_0 = V_{\max} \cdot S / (K_m + S)$$

ここで v_0 は取り込みの初速度 (pmol/min/mg protein)、 V_{\max} は最大取り込み速度 (pmol/min/mg protein)、 K_m は Michaelis-Menten 定数 (µM)、 S は transport buffer 中のアコチアミド濃度 (µM) を示す。 K_m 、 V_{\max} 、 P_{dif} は Phoenix WinNonlin Ver.6.4 (Certara, St. Louis, MO) を用いて、非線形最小二乗法によりあてはめ計算を行い求めた。

2-9 統計解析

統計的有意差の検定は、Student の t-test により実施し、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

2-10 免疫組織化学的染色

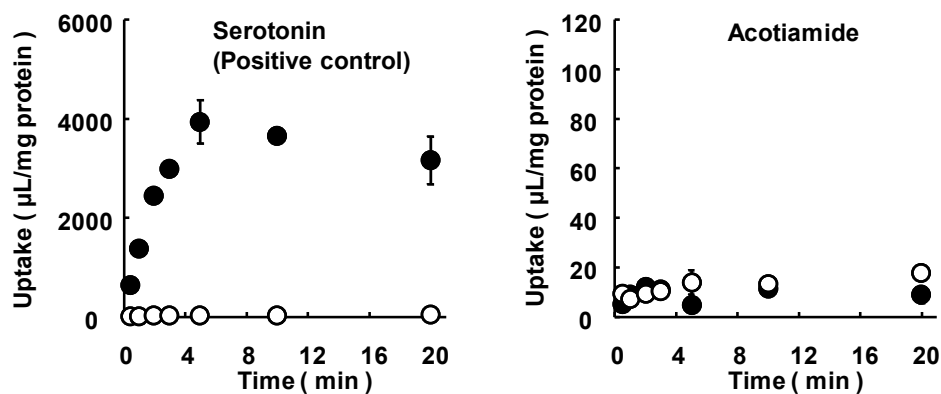
10%中性緩衝ホルマリン液を用いて、胃組織凍結切片スライドを室温で 15 分間インキュベートした。PBS を用いて、胃組織凍結切片スライドを室温で 5 分間、3 回洗浄した。0.2% サポニン含有 PBS を用いて、胃組織凍結切片スライドを室温で 5 分間インキュベートした。PBS を用いて、胃組織凍結切片スライドを室温で 5 分間、3 回洗浄した。PBS で希釈した正常ウマ血清を用いて、胃組織凍結切片スライドを室温で 20 分間インキュベートすることによりブロッキングした。PBS で 200 倍に希釈した 1 次抗体を胃組織凍結切片スライドに載せて、室温で 1 時間インキュベートした。PBS を用いて、凍結切片スライドを室温で 5 分間、3 回洗浄した。内因性ペルオキシダーゼ失活処理液を用いて、室温で 5 分間インキュベートした。ビオチン標識抗ヤギ IgG 抗体を凍結切片スライドに載せて、室温で 30 分間インキュベートした。PBS を用いて、凍結切片スライドを室温で 5 分間、3 回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを凍結切片スライドに載せて、室温で 10 分間インキュベートした。PBS を用いて、凍結切片スライドを室温で 5 分間、3 回洗浄した。DAB 発色液を凍結切片スライドに載せて、室温で 5 分間インキュベートした。蒸留水に浸して、反応を止めた。マイヤー・ヘマトキシリンを凍結切片スライドに載せて、室温で 5 分間インキュベートした。流水を用いて、室温で 10 分間洗浄した。封入剤 VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を凍結切片スライドに添加し、カバーガラスをかけた。マニユキアを用いてシールした後、顕微鏡下で観察した。

第3節 結果

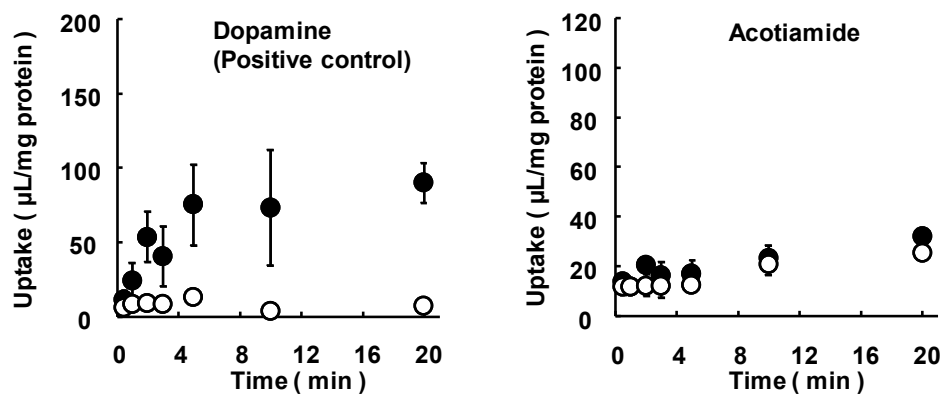
3-1 SERT、DAT、NET によるアコチアミド取り込み試験

SERT 一過性過剰発現 HEK293 細胞、DAT 一過性過剰発現 HEK293 細胞、NET 一過性過剰発現 HEK293 細胞へのアコチアミド取り込みを検討した結果を Figure 4-1 に示す。SERT の陽性対照基質として $[^3\text{H}]$ セロトニン (50 nmol/L) の取り込みを、DAT の陽性対照基質として $[^3\text{H}]$ ドパミン (50 nmol/L) の取り込みを、NET の陽性対照基質として $[^3\text{H}]$ ノルエピネフリン (50 nmol/L) の取り込みを検討した。いずれの細胞においても、陽性対照基質の取り込みはコントロール細胞 (空ベクターをトランスフェクションした Mock 細胞) と比して高くなったが、アコチアミドの取り込み活性の増加は示されなかった。

(A)



(B)



(C)

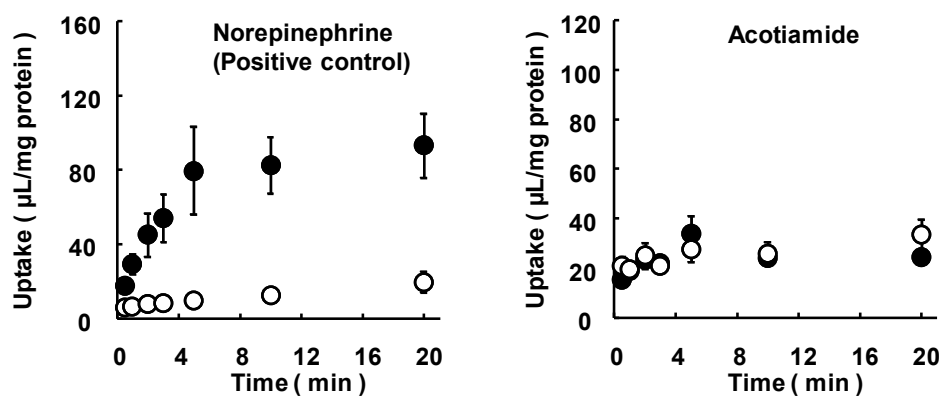


Figure 4-1. Uptake of acotiamide by SERT (A), DAT (B) and NET (C).

Time course of acotiamide uptake (5 μM) was evaluated in transporter gene-transfected cells (closed circles) and control cells (open circles) over 20 min. Serotonin, dopamine and norepinephrine were used as a positive control substrate for SERT, DAT and NET, respectively. Each point and vertical bar represents the mean±S.E. for four experiments.

3-2 OCT1、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、MATE1、MATE2-Kによるアコチアミド取り込み試験

OCT1 安定発現 CHO 細胞、OCT2 安定発現 CHO 細胞、OATP1B1 安定発現 CHO 細胞、OATP1B3 安定発現 CHO 細胞、OATP1B3 安定発現 MDCKII 細胞、OAT1 安定発現 CHO 細胞、OAT3 安定発現 HEK293 細胞、MATE1 安定発現 MDCKII 細胞、MATE2-K 安定発現 MDCKII 細胞へのアコチアミド細胞内蓄積を検討した結果を Table 4-1 に示す。各トランスポーターの陽性対照基質及び阻害剤の検討結果を Table4-2 に示す。いずれの細胞においても、陽性対照基質の取り込みは Mock 細胞と比して高く、また阻害薬の作用も観測され、試験系としては十分であったが、アコチアミドの細胞内蓄積の増加はいずれのトランスポーターによってもみられなかった。

Table 4-1. The cellular accumulation of acotiamide by Mock cells and transporter-transfected cells

Transporter	Incubation time (min)	Accumulation (pmol/mg protein)						Fold change
		Transfected cells			Control cells			
OCT1	2	23.58	±	3.20	18.28	±	0.30	1.29
	20	29.99	±	1.12	26.56	±	2.49	1.13
OCT2	2	17.44	±	1.30	17.77	±	0.63	0.98
	20	31.83	±	1.40	24.05	±	2.19	1.33
OCT3	2	39.56	±	1.97	35.55	±	1.14	1.11
	20	96.37	±	15.06	66.73	±	2.90	1.44
OATP1B1	2	60.66	±	15.59	37.28	±	5.91	1.63
	20	71.06	±	7.01	48.20	±	1.36	1.47
OATP1B3	2	63.22	±	14.61	33.10	±	3.09	1.91
	20	84.10	±	0.92	48.55	±	1.53	1.73
OATP2B1	2	27.80	±	2.53	33.00	±	4.28	0.84
	20	48.78	±	2.19	31.24	±	3.31	1.56
OAT1	2	36.02	±	9.87	29.77	±	2.95	1.21
	20	45.65	±	5.17	49.27	±	2.38	0.93
OAT3	2	48.34	±	3.60	33.91	±	2.11	1.43
	20	72.12	±	5.64	54.64	±	2.42	1.32
MATE1	2	20.97	±	2.04	22.24	±	2.14	0.94
	20	42.96	±	2.16	43.29	±	2.43	0.99
MATE2-K	2	26.96	±	0.98	20.67	±	1.86	1.30
	20	52.22	±	1.19	38.65	±	3.85	1.35

Table 4-2. The cellular accumulation of positive controls related to the uptake transporter substrate feasibility assays

Transporter	Substrate	Incubation time (min)	inhibitor	Fold change
OCT1	$[^{14}\text{C}]$ Metformin (4 $\mu\text{mol/L}$)	20	control	28.21
			+Verapamil (100 $\mu\text{mol/L}$)	7.29
OCT2	$[^{14}\text{C}]$ Metformin (4 $\mu\text{mol/L}$)	10	control	46.82
			+Verapamil (100 $\mu\text{mol/L}$)	2.46
OCT3	$[^3\text{H}]$ MPP+ (0.02 $\mu\text{mol/L}$)	3	control	7.19
			+Quinidine (1000 $\mu\text{mol/L}$)	1.72
OATP1B1	$[^3\text{H}]$ E3S (0.1 $\mu\text{mol/L}$)	10	control	10.49
			+Cerivastatin (100 $\mu\text{mol/L}$)	1.46
OATP1B3	Fluo-3 (10 $\mu\text{mol/L}$)	10	control	3.65
			+Fluvastatin (30 $\mu\text{mol/L}$)	1.16
OATP2B1	$[^3\text{H}]$ E3S (0.2 $\mu\text{mol/L}$)	2	control	10.64
			+Fluvastatin (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.44
OAT1	$[^3\text{H}]$ PAH (1.33 $\mu\text{mol/L}$)	3	control	10.83
			+Benzbromarone (200 $\mu\text{mol/L}$)	1.50
OAT3	$[^3\text{H}]$ Methotrexate (0.1 $\mu\text{mol/L}$)	5	control	24.06
			+Probenecid (200 $\mu\text{mol/L}$)	2.22
MATE1	$[^{14}\text{C}]$ Metformin (10 $\mu\text{mol/L}$)	15	control	8.70
			+Pyrimethamine (1 $\mu\text{mol/L}$)	1.81
MATE2-K	$[^{14}\text{C}]$ Metformin (10 $\mu\text{mol/L}$)	15	control	10.16
			+Pyrimethamine (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.59

Fluo-3 transport (OATP1B3) was determined by measuring fluorescence using 485 nm and 520 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. Radiolabelled probe substrate transport was determined by liquid scintillation counting.

3-3 PMAT によるアコチアミド取り込みの時間依存性

PMAT 一過性過剰発現 HEK293 細胞へのアコチアミド取り込みを検討した結果を Figure 4-2 に示した。PMAT の陽性対照基質として $[^3\text{H}]$ ドパミン (50 nmol/L) の取り込みを検討した。反応時間 3 分におけるアコチアミドの PMAT 一過性過剰発現 HEK293 細胞への取り込み量は、83.4 $\mu\text{L}/\text{mg protein}$ を示し、Mock 細胞への取り込み量 17.6 $\mu\text{L}/\text{mg protein}$ と比して大きい値であった。また、その取り込み量は時間依存的に上昇した。

PMAT におけるアコチアミドの取り込みは、反応時間 3 分までは直線的な増加がみられたため、以降の速度論的解析では、0 分から 3 分における取り込み量から取り込み初速度を求め評価した。

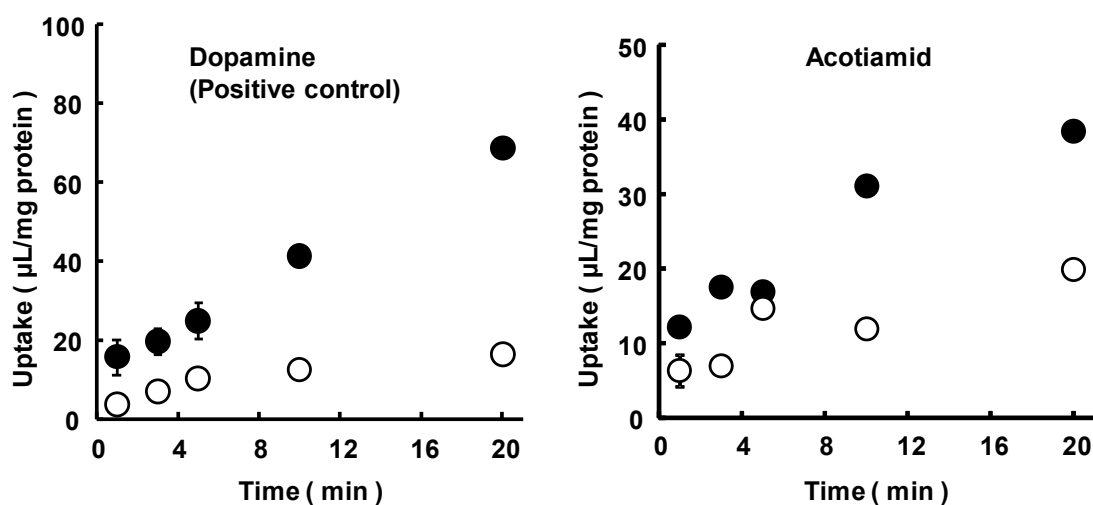


Figure 4-2. Time course of acotiamide uptake (5 μM) by PMAT.

Time course of acotiamide uptake (5 μM) was evaluated in transporter gene-transfected cells (closed circles) and control cells (open circles) over 20 min. Each point and vertical bar represents the mean \pm S.E. for four experiments.

3-4 PMAT によるアコチアミド取り込みの濃度依存性

アコチアミド濃度を 5 μM から 800 μM まで変えたときの PMAT による取り込み初速度を検討した結果を Figure 4-3 に示す。PMAT 一過性過剰発現 HEK293 細胞における取り込み初速度から Mock 細胞における取り込み初速度を差し引いた値を PMAT による取り込み初速度とし、速度論的解析を行った。

PMAT によるアコチアミドの取り込みは、1 つの飽和性コンポーネントによって解析された。 K_m と V_{\max} はそれぞれ 198 μM および 1150 $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg protein}$ と算出された。Eadie-Hofstee plot から 1 つの飽和性コンポーネントから成ることを示唆する結果が得られた。得られた K_m は第 3 章で実施された Hs 746T 細胞におけるアコチアミド取り込みの K_m (106 μM) と同程度の値であった。

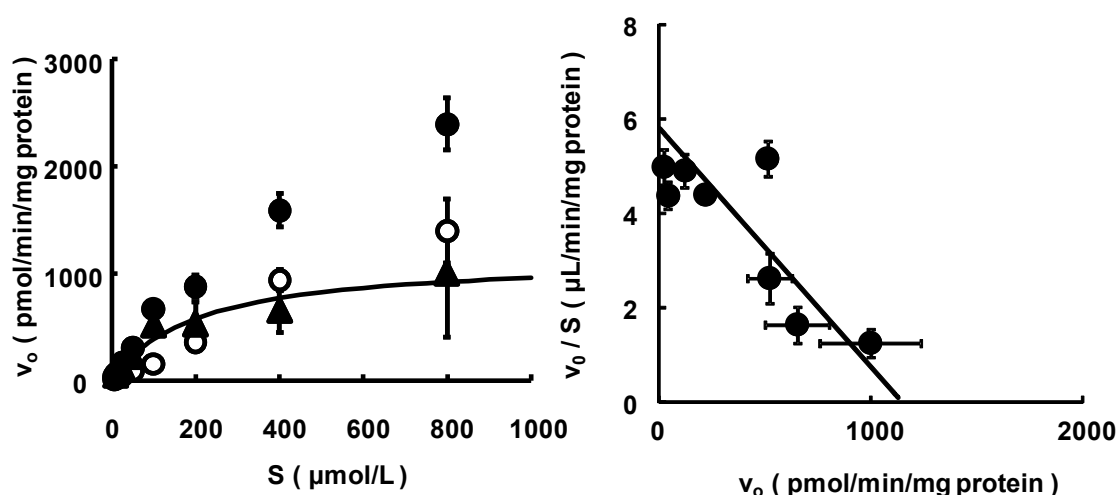


Figure 4-3. Concentration dependence of acotinamide uptake by PMAT-expressing HEK293 cells.

Uptake of acotinamide by PMAT-expressing cells was measured at various concentrations of acotinamide for 3 min. PMAT-mediated acotinamide uptake (closed triangle) was calculated by subtracting the uptake in HEK293/Mock (open circles) from that in HEK293/PMAT cells (closed circles). Each point and vertical bar represents the mean \pm S.E. for six experiments. The uptake of acotinamide at various concentrations is shown in an Eadie-Hofstee plot. The solid line represents the calculated values using kinetic parameters obtained by nonlinear least-squares analysis.

3-5 PMAT によるアコチアミド取り込みにおける駆動力の検討

PMAT によるアコチアミド取り込みに対して、pH 依存性及び Na^+ 依存性を検討した結果を Figure 4-4 に示す。pH 依存性については、Transport buffer の pH を 6.2~8.0 の範囲で調整し、取り込み初速度を検討した。 Na^+ 依存性については、Transport buffer 中の Na^+ を NMG^+ 、 Li^+ または choline と置換し、取り込み初速度を検討した。PMAT 一過性過剰発現 HEK293 細胞における取り込み初速度から Mock 細胞における取り込み初速度を差し引いた値を PMAT による取り込み初速度とした。いずれの条件においても、取り込み初速度への影響は検出されなかった。

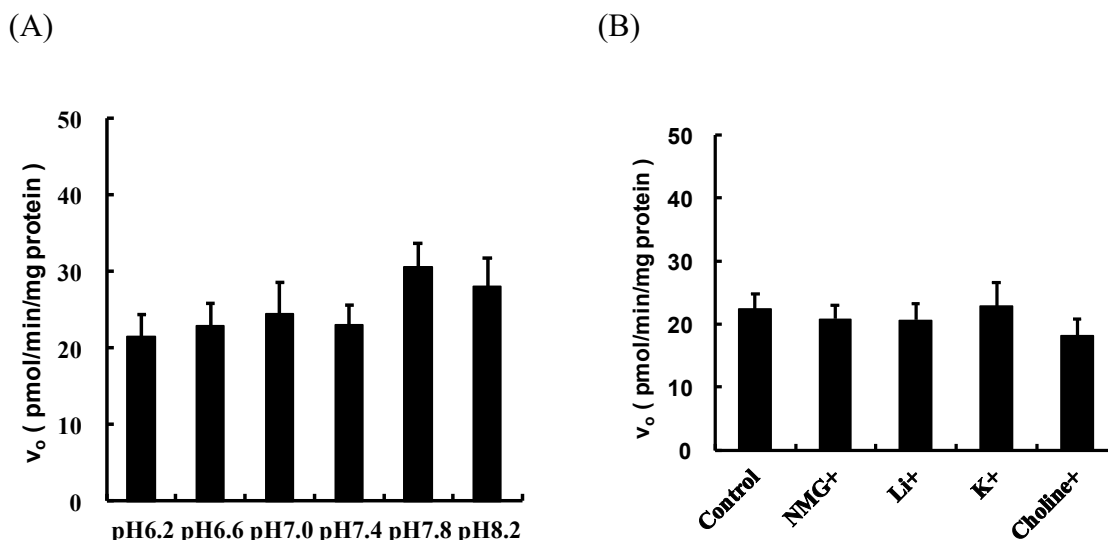


Figure 4-4. The effects of pH and Na^+ on acotiamide uptake by PMAT.

(A) Initial uptake rate of acotiamide (5 μM) by PMAT was measured in transport buffer at various pH values in the range from 6.2 to 8.0. (B) We substituted control transport buffer by replacing Na^+ with NMG^+ , Li^+ or choline. Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E. for four experiments.

3-6 PMAT によるアコチアミド取り込みに対する阻害剤の検討

PMAT によるアコチアミド取り込みに対する PMAT 阻害剤である decynium 22[88]、fluvoxamine の影響を検討した結果を Figure 4-5 に示す。PMAT 一過性過剰発現 HEK293 細胞における取り込み初速度は、decynium 22、および fluvoxamine 存在下において、有意に低下した。

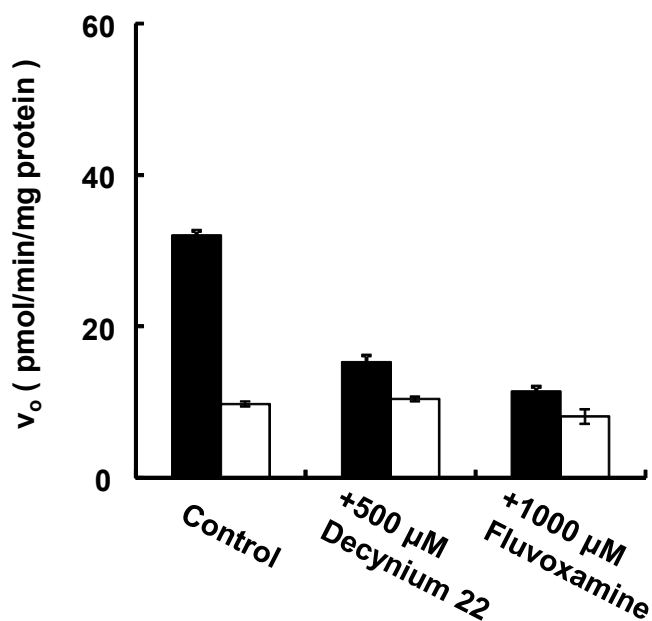


Figure 4-5. Inhibitory effect of PMAT inhibitors on acotiamide uptake in HEK293/PMAT cells (closed column) and HEK293/Mock cells (open column).

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E for four experiments.

3-7 ヒト胃組織における PMAT タンパク質の局在

胃における PMAT タンパク質の局在を免疫組織化学的染色で検討した (Figure 4-6)。茶のシグナルは PMAT を、青藍色のシグナルは核を示す。胃組織凍結切片において PMAT は、胃平滑筋細胞及び胃血管内皮細胞に発現が認められた。また、そのシグナルはブロッキングペプチド存在下で消失した。

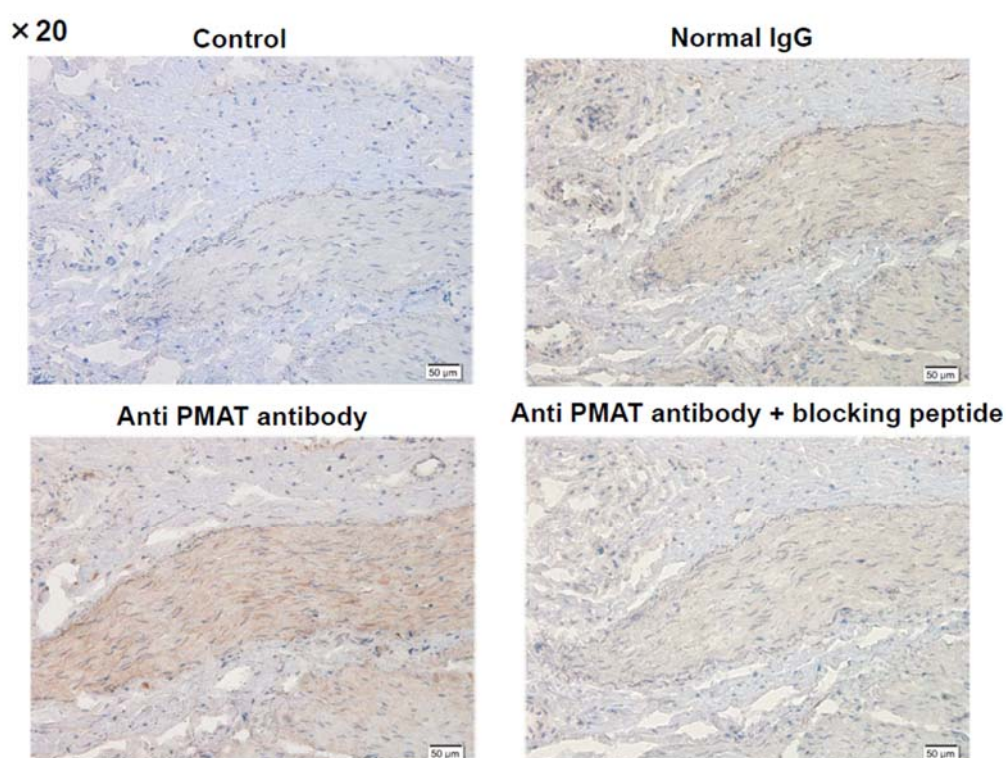


Figure 4-6. Immunohistochemical localization of PMAT in human stomach tissue. Sections from human stomach were incubated with an anti-PMAT antibody (200-fold dilution) or goat normal IgG. Expression of PMAT is indicated by brown coloration using the immunoperoxidase method. PMAT is labeled in brown. In control sections labeled with goat normal IgG, the brown signal was negligible. Scale bar, 50 μ m.

第4節 考察

本章では、アコチアミドが基質として認識されるトランスポーター分子の探索を、過剰発現細胞を用いて行った。第3章の Hs 746T 細胞におけるアコチアミド取り込み試験結果から、SSRIs によって阻害されるトランスポーターがアコチアミド取り込みに関与することが示唆された。SSRIs によって阻害されることが報告されているトランスポーターとして、SERT、DAT、NET (Table 3-1 参照)、PMAT[75]、OCT1[76]、OCT3[77]、VMAT[78]などが報告されている。しかし、VMAT は H^+ 依存性のシナプス小胞モノアミントランスポーターであり、細胞内局在性や駆動力の点からアコチアミドの組織移行に関わる可能性が低いことから VMAT1 及び VMAT2 は対象から除外し、SERT、DAT、NET、PMAT、OCT1、OCT3 を対象分子とした。また、薬物動態学的観点から重要である OCT2、OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、OAT1、OAT3、MATE1、MATE2-K に対しても、過剰発現細胞を用いた検討を実施した。

まず、SERT、DAT、NET におけるアコチアミド取り込み試験を実施したが、これらの基質にならないことが判明した。SERT、DAT、NET は Na^+/Cl^- 依存性神経伝達物質トランスポーターファミリーに属しており、トランスポーターは細胞内外の Na^+ と Cl^- の濃度勾配を利用し、 Na^+ と Cl^- と共に基質を共輸送する[95]。SERT、DAT、NET の基質となった場合、第2章において、Hs 746T 細胞でのアコチアミド取り込みに Na^+ 依存性が観察されなかったことと合致しないため、本結果は妥当であると判断した。

続いて、OCT1、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、MATE1、MATE2-K におけるアコチアミド取り込み試験を実施したが、これらの基質にもならないことが判明した。以上より、SERT、DAT、NET、OCT1、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、OATP1B3、OAT1、OAT3、MATE1 及び MATE2-K はアコチアミド胃組織移行に関与しないとの結論に至った。OCT1、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、MATE1、MATE2-K においては、吸収に関与する小腸や、クリアランス臓器である肝臓・

腎臓などで発現し、併用薬との薬物動態学的薬物相互作用の作用点にもなりうる [96,97,98,99]。したがって、アコチアミドはこれらトランスポーター上での DDI により血中濃度が増大してしまうようなリスクは低いと考えられる。

さらに、アコチアミドの PMAT による認識性を検討したところ、アコチアミドは PMAT の基質となる結果が得られた。PMAT によるアコチアミド輸送には Na^+ 依存性も pH 依存性も観察されず、Hs 746T 細胞でのアコチアミド取り込みに特性と一致する。PMAT による基質輸送は Na^+ 非依存性、 Cl^- 非依存性であり [100,101]、PMAT によるアコチアミド輸送結果と一致する。しかし、pH 依存性の MPP^+ 輸送の報告もある。このような相反する結果は、基質に応じて駆動力が異なる可能性、pH による基質のイオン化状態の変動が影響している可能性が考えられる。PMAT 過剰発細胞におけるアコチアミド取り込みに対し、PMAT 阻害剤である decynium 22 および fluvoxamine が阻害作用を示したこともあわせ、アコチアミドは PMAT の基質であると判断した。なお、本検討では、PMAT に対する decynium 22 の K_i (0.22 M) [88] より十分高い濃度で実施した。

PMAT におけるアコチアミド取り込みの濃度依存性を検討した結果、 K_m は $197.8 \mu\text{M}$ であった。得られた K_m は第 3 章で実施された Hs 746T 細胞におけるアコチアミド取り込みの K_m ($106 \mu\text{M}$) と同程度の値であり、アコチアミドの胃組織移行に PMAT が寄与していると考えられた。

SLC29A4 によってコードされる Plasma membrane monoamine transporter (PMAT, ENT4) は低親和性モノアミントランスポーターであり、ヌクレオシドトランスポーター Equilibrative nucleoside transporter (ENT) ファミリーに属する [103]。PMAT はドパミンなどの神経伝達物質を基質とすることに加え、 MPP^+ や TEA などのカチオン性化合物を基質とすることも報告されている [88,100,101]。PMAT は Organic cation transporter (OCT) の基質認識性と類似しており、脳、心臓、小腸、膵臓、腎臓、骨格筋、肝臓などの広範な組織に分布することが報告 [101,104,105] されていることから、近年、薬物トランスポーターとし

でも注目を集め始めている。しかし、PMAT の胃組織における発現情報は存在しない。そこで、本章ではさらに、PMAT タンパク質の胃組織における発現を免疫組織化学的染色で検討した。胃組織凍結切片において、PMAT は胃平滑筋細胞及び胃血管内皮細胞に発現が観察された。循環血中から胃組織へのアコチアミド移行は、胃血管内皮細胞に発現する PMAT を介して分布していることが予想される。また、胃平滑筋細胞にも PMAT が発現していたが、胃筋層内の特に神経細胞周囲にアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性が発現しており[8]、薬理ターゲット近傍へのアコチアミド分布にも、PMAT を介し効率的な薬効発現に寄与していることが推察される。

以上より、アコチアミドを基質として認識するトランスポーターとして、PMAT が同定された。また、PMAT が胃組織に発現していることから、アコチアミドの胃への分布にも関与している可能性が示唆された (Figure 4-7)。アコチアミドの胃への薬物分布のみならず、薬理効果発現の決定因子としても PMAT が重要となる。しかし、PMAT 以外の胃組織輸送担体の関与も否定できない。また、FD 患者における PMAT 機能に関する報告はない。よって、FD 疾患状態での PMAT 機能解析、ヒトでの PMAT 機能の検討が、今後の検討課題である。

さらに、PMAT は消化管吸収にも寄与することが報告されており、アコチアミドの消化管吸収にも関与している可能性が考えられる (Figure 4-7)。薬物動態学的側面からは、アコチアミド消化管吸収への PMAT およびその他のトランスポーター分子の関与を検討することが、今後の課題となる。

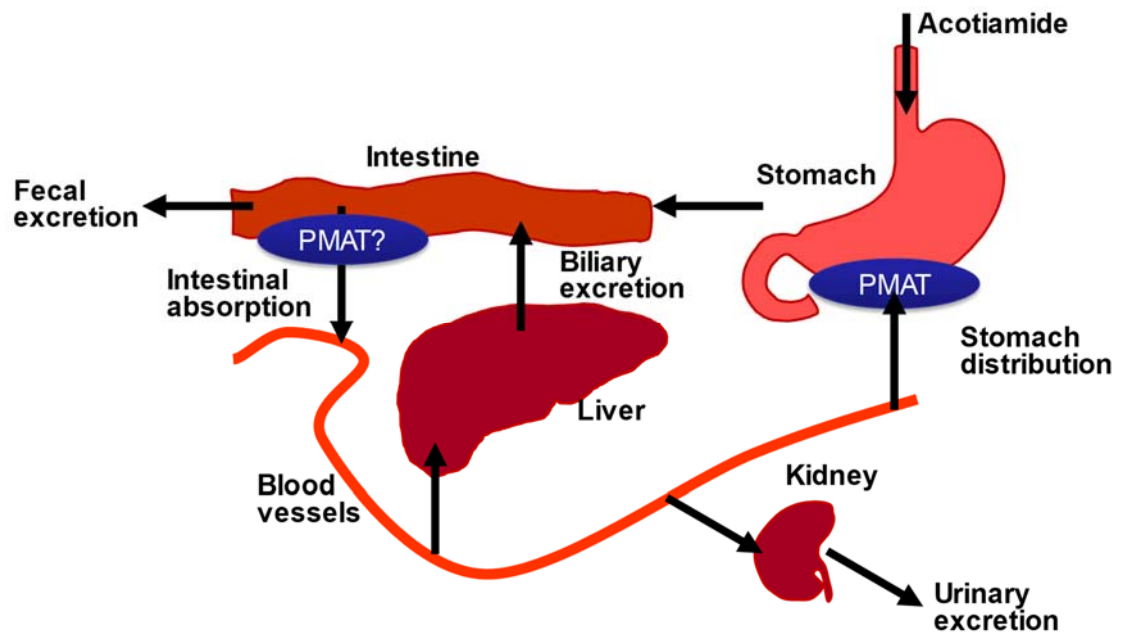


Figure 4-7. Schematic representation of acotiamide distribution in the body and PMAT localization

第5章 結論

本研究においては、機能性ディスぺプシア（FD）治療薬アコチアミドの胃組織蓄積性着目し、アコチアミドの胃組織移行機構の解析を行った。全体として、1）ラットを用いた薬物動態特性、2）胃細胞モデル Hs 746T 細胞におけるアコチアミドの細胞内取り込み特性とトランスポーター阻害薬の作用、3）トランスポーター発現細胞を用いたアコチアミド輸送活性の有無の検討、ならびに4）候補となったトランスポーターPMAT の胃組織発現の検討を行った。

第2章では、アコチアミドと同様に胃組織を薬効発現部位とするイトプリドを対照に、皮下投与時のラット胃組織移行性を検討した。経口投与時には、胃組織管腔は薬物に晒されるため、血中からの胃組織移行を評価するには不適切であることから皮下投与時の薬物動態を検討した。アコチアミドはイトプリドより胃組織中濃度の消失が遅いが、イトプリドと同等以上に胃組織移行が高いことが示された。

第3章では、胃癌由来細胞である Hs 746T 細胞を用い、アコチアミド細胞内取り込み実験を実施した。Hs 746T 細胞へのアコチアミドの取り込みは、飽和性を示すコンポーネントと非飽和的コンポーネントから構成され、飽和性を示すコンポーネントの K_m は $106\ \mu\text{M}$ であり、トランスポーターが介在していると考えられた。Hs 746T 細胞におけるアコチアミド取り込みについて、輸送駆動力の観点から特徴づけることを試みた。しかし、pH 依存性や Na^+ 依存性は検出されず駆動力については明らかにできなかったため、駆動力の観点からトランスポーターの絞り込みは行えなかった。続いて、アコチアミド輸送分子候補の絞り込みのために、アコチアミドの取り込みに対する各種トランスポーター阻害剤の影響を検討した。阻害試験の結果、fluvoxamine、sertraline、fluoxetine 及び serotonin などの選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRIs）は共通してアコチアミド取り込みを低下させる結果が得られた。

第4章では、トランスポーターの過剰発現細胞を使用し、アコチアミド認識性について検討した。対象としたトランスポーターとして、SSRIs によって阻害されることが報告されて

いる SERT、DAT、NET、PMAT、OCT1、OCT3 を選択し実施した。また、薬物動態学的観点から重要である OCT2、OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、OAT1、OAT3、MATE1、MATE2-K に対しても、過剰発現細胞を用いた検討を実施した。その結果、アコチアミドは SERT、DAT、NET、OCT1、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、OATP1B3、OAT1、OAT3、MATE1、MATE2-K による輸送は観測されなかった。一方、アコチアミドは PMAT (SLC29A4) の基質となることを見出された。PMAT によるアコチアミド輸送には、Na⁺依存性や pH 依存性は観察されず、Hs 746T 細胞でのアコチアミド取り込み特性と一致する。また、PMAT によるアコチアミド取り込みは、PMAT 阻害作用を有する decynium 22 および fluvoxamine による低下したことから、アコチアミドは PMAT の基質であると判断した。PMAT におけるアコチアミド取り込みの濃度依存性を検討した結果、PMAT によるアコチアミドの取り込みにおける Km は 197.8 μ M であり、Hs 746T 細胞におけるアコチアミド取り込みの Km (106 μ M) と同程度の値であり、アコチアミドの胃組織移行に PMAT が寄与していると考えられた。PMAT は脳、心臓、小腸、膵臓、腎臓、骨格筋、肝臓などの広範な組織に分布することが報告されているが、胃組織における発現に関する情報はない。そこで PMAT タンパク質の胃組織における発現を免疫組織化学的染色で検討した。その結果、ヒト胃組織凍結切片において、PMAT は胃平滑筋細胞及び胃血管内皮細胞に発現が観察された。

以上の結果から、アコチアミドは PMAT を介し薬効発現ターゲットである胃組織に濃縮的に移行していると考えられた。これらの情報は、薬理効果を考察するうえでも重要となる。ヒト *in vivo* でのアコチアミド胃組織移行について直接証明することは非常に難しいが、本検討により、PMAT がアコチアミド組織移行に寄与している可能性を示唆できた。PMAT は胃組織のみならず、小腸や脳においても発現しており、カチオン性薬物の消化管吸収や血液脳関門を介した脳内移行への関与に対するさらなる研究が期待される。

第6章 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました金沢大学大学院
医薬保健学総合研究科 薬物動態学研究室 教授 玉井郁巳 先生に衷心深甚なる感謝の意を
表します。

本研究の推進にあたり、種々の御指導、御討論いただきました高崎健康福祉大学 薬学
部 教授 中西猛夫先生に心より感謝申し上げます。

さらに、本研究の機会をいただきましたゼリア新薬工業株式会社 中央研究所 所長 黒
田博之博士、同研究所動態・安全性研究室長 川端慶宏博士に深く感謝申し上げます。

また、本研究に際し、様々な面で御協力いただきましたゼリア新薬工業株式会社 中央
研究所の皆様にご礼申し上げます。

最後に、深い理解と温かい愛情を持って、私を支援していただきました家族に心から感
謝いたします。

第7章 引用文献

1. Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada JR, Stanghellini V. Functional Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1466-1479.
2. Ahluwalia NK, Thompson DG, Mamtora H, Hindle J. Evaluation of gastric antral motor performance in patients with dysmotility-like dyspepsia using real-time high-resolution ultrasound. *Neurogastroenterol Motil.* 1996; 8: 333-338.
3. 日本消化器病学会 機能性消化管疾患診療ガイドライン 2014 -機能性ディスペプシア(FD) 南江堂 2014
4. Olsson C, Holmgren S. The control of gut motility. *Comp Biochem Physiol* 2001; 128(3): 481-503.
5. Matsunaga Y, Tanaka T, Yoshinaga K, Ueki S, Hori Y, Eta R, Kawabata Y, Yoshii K, Yoshida K, Matsumura T, Furuta S, Takei M, Tack J, Itoh Z. Acotiamide hydrochloride acotiamide, a new selective acetylcholinesterase inhibitor, enhances gastric motility without prolonging QT interval in dogs: comparison with cisapride, itopride, and mosapride. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336: 791-800.
6. Nagahama K, Matsunaga Y, Kawachi M, Ito K, Tanaka T, Hori Y, Oka H, Takei M. Acotiamide, a new orally active acetylcholinesterase inhibitor, stimulates gastrointestinal motor activity in conscious dogs. *Neurogastroenterol Motil.* 2012 ;24: 566-574.
7. Kawachi M, Matsunaga Y, Tanaka T, Hori Y, Ito K, Nagahama K, Ozaki T, Inoue N, Toda R, Yoshii K, Hirayama M, Kawabata Y, Takei M. Acotiamide hydrochloride acotiamide enhances gastric motility and emptying by inhibiting acetylcholinesterase activity in rats. *Eur J Pharmacol.* 2011; 666: 218-225.
8. Matsueda K, Hongo M, Tack J, Saito Y, Kato H. A placebo-controlled trial of acotiamide for meal-related symptoms of functional dyspepsia. *Gut.* 2012; 61: 821-8.

9. Yoshii K, Yamaguchi T, Hirayama M, Toda R, Kinomoto T, Kawabata Y, Chiba K. Distribution of acotiamide, an orally active acetylcholinesterase inhibitor, into the myenteric plexus of rat and dog stomachs. *Life Sciences* 2016; 145: 93–97.
10. ゼリア新薬工業株式会社. アコファイド錠 CTD
11. Furuta S, Kamada E, Omata T, Sugimoto T, Kawabata Y, Yonezawa K, Wu XC, Kurimoto T. Drug-drug interactions of acotiamide, a novel gastroprokinetic agent, with terfenadine, comparison with cisapride, and involvement of UGT1A9 and 1A8 in the human metabolism of acotiamide. *Eur J Pharmacol.* 2004; 497: 223-31.
12. Yoshii K, Hirayama M, Nakamura T, Toda R, Hasegawa J, Takei M, Mera Y, Kawabata Y. Mechanism for distribution of acotiamide, a novel gastroprokinetic agent for the treatment of functional dyspepsia, in rat stomach. *J Pharm Sci.* 2011; 100: 4965-73.
13. Yoshii K, Iikura M, Hirayama M, Toda R, Kawabata Y. Physiologically-Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modeling for the Inhibition of Acetylcholinesterase by Acotiamide, A Novel Gastroprokinetic Agent for the Treatment of Functional Dyspepsia, in Rat Stomach. *Pharm Res.* 2016; 33: 292-300.
14. Hongo M, Harasawa S, Mine T, Sasaki I, Matsueda K, Kusano M, Hanyu N, Nakada K, Shibata C. Large-scale randomized clinical study on functional dyspepsia treatment with mosapride or teprenone: Japan Mosapride Mega-Study (JMMS). *J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 27: 62-8.
15. Holtmann G, Talley NJ, Liebrechts T, Adam B, Parow C. A placebo-controlled trial of itopride in functional dyspepsia. *N Engl J Med.* 2006; 354: 832-840.
16. Talley NJ, Tack J, Ptak T, Gupta R, Giguère M. Itopride in functional dyspepsia: results of two phase III multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trials. *Gut.* 2008; 57: 740-746.

17. Hallerbäck BI, Bommelaer G, Bredberg E, Campbell M, Hellblom M, Lauritsen K, Wienbeck M, Holmgren LL. Dose finding study of mosapride in functional dyspepsia: a placebo-controlled, randomized study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002; 16: 959-967
18. 山田健久, 塚田敏孝, 高原栄二, 永田治 HSR-803 の体内動態 (第1報) - ラットおよびイヌにおける単回投与時の吸収, 分布および排泄. *薬物動態.* 1994; 9: 308-326.
19. 山田健久, 塚田敏孝, 高原栄二, 永田治 HSR-803 の体内動態 (第2報) - ラットにおける反復投与試験および胎仔, 乳汁移行性. *薬物動態.* 1994; 9: 327-340.
20. 山田健久, 塚田敏孝, 高原栄二, 永田治 HSR-803 の体内動態 (第3報) - ラットおよびイヌにおける代謝. *薬物動態.* 1994; 9: 341-350.
21. 山田健久, 反保浩一, 奥村公紀, 高原栄二, 永田治 塩酸イトプリドのラットにおける胃筋層への分布 - ラジオルミノグラフィーによる定量的解析 -. *薬物動態.* 1999; 11: 139-146.
22. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 46: 27-43.
23. Artursson P, Borchardt RT. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm Res.* 1997; 14: 1655-8
24. Takenaka T, Harada N, Kuze J, Chiba M, Iwao T, Matsunaga T. Human small intestinal epithelial cells differentiated from adult intestinal stem cells as a novel system for predicting oral drug absorption in humans. *Drug Metab Dispos.* 2014; 42: 1947-54.
25. Yamaura Y, Chapron BD, Wang Z, Himmelfarb J, Thummel KE. Functional Comparison of Human Colonic Carcinoma Cell Lines and Primary Small Intestinal Epithelial Cells for Investigations of Intestinal Drug Permeability and First-Pass Metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2016; 44: 329-35.
26. Iwao T, Kodama N, Kondo Y, Kabeya T, Nakamura K, Horikawa T, Niwa T, Kurose K,

- Matsunaga T. Generation of enterocyte-like cells with pharmacokinetic functions from human induced pluripotent stem cells using small-molecule compounds. *Drug Metab Dispos.* 2015; 43: 603-10.
27. Ozawa T, Takayama K, Okamoto R, Negoro R, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Mizuguchi H. Generation of enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells for drug absorption and metabolism studies in human small intestine. *Sci Rep.* 2015; 5: 16479.
 28. Kodama N, Iwao T, Katano T, Ohta K, Yuasa H, Matsunaga T. Characteristic Analysis of Intestinal Transport in Enterocyte-Like Cells Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Drug Metab Dispos.* 2016t ;44: 0.
 29. Kimura T, Higaki K. Gastrointestinal transit and drug absorption. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25: 149-64.
 30. Smith HS. In vitro properties of epithelial cell lines established from human carcinomas and nonmalignant tissue. *J Natl Cancer Inst.* 1979; 62: 225-30.
 31. Park JG, Frucht H, LaRocca RV, Bliss DP Jr, Kurita Y, Chen TR, Henslee JG, Trepel JB, Jensen RT, Johnson BE, et al. Characteristics of cell lines established from human gastric carcinoma. *Cancer Res.* 1990; 50: 2773-80.
 32. Li AP. Primary hepatocyte cultures as an in vitro experimental model for the evaluation of pharmacokinetic drug-drug interactions. *Adv Pharmacol.* 1997; 43: 103-30.
 33. Jigorel E, Le Vee M, Boursier-Neyret C, Bertrand M, Fardel O. Functional expression of sinusoidal drug transporters in primary human and rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33: 1418-22
 34. Griffin SJ, Houston JB. Prediction of in vitro intrinsic clearance from hepatocytes: comparison of suspensions and monolayer cultures. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33: 115-20.
 35. Xia CQ, Milton MN, Gan LS. Evaluation of drug-transporter interactions using in vitro and

in vivo models. *Curr Drug Metab.* 2007; 8: 341-63.

36. Hirabayashi Y, Nomura KH, Nomura K. The acetyl-CoA transporter family SLC33. *Mol Aspects Med.* 2013; 34: 586-9.
37. Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y. Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem.* 1996; 271: 14883-90.
38. Simmons WW, Closs EI, Cunningham JM, Smith TW, Kelly RA. Cytokines and insulin induce cationic amino acid transporter (CAT) expression in cardiac myocytes. Regulation of L-arginine transport and no production by CAT-1, CAT-2A, and CAT-2B. *J Biol Chem.* 1996; 271: 11694-702.
39. Fraga S, Serrão MP, Soares-da-Silva P. L-type amino acid transporters in two intestinal epithelial cell lines function as exchangers with neutral amino acids. *J Nutr.* 2002; 132: 733-8.
40. Kim DK, Kanai Y, Choi HW, Tangtrongsup S, Chairoungdua A, Babu E, Tachampa K, Anzai N, Iribe Y, Endou H. Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1565: 112-21.
41. Liu QR, López-Corcuera B, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N. Molecular characterization of four pharmacologically distinct gamma-aminobutyric acid transporters in mouse brain. *J Biol Chem.* 1993; 268: 2106-12.
42. Annaert P, Ye ZW, Stieger B, Augustijns P. Interaction of HIV protease inhibitors with OATP1B1, 1B3, and 2B1. *Xenobiotica.* 2010; 40: 163-76
43. Kim RB, Leake B, Cvetkovic M, Roden MM, Nadeau J, Walubo A, Wilkinson GR. Modulation by drugs of human hepatic sodium-dependent bile acid transporter (sodium taurocholate cotransporting polypeptide) activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 291: 1204-9.

44. Hagenbuch B, Meier PJ. Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest.* 1994; 93: 1326-31.
45. Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4: 13-25.
46. Inazu M. Choline transporter-like proteins CTLs/SLC44 family as a novel molecular target for cancer therapy. *Biopharm Drug Dispos.* 2014; 35: 431-49.
47. Ndika JD, Lusink V, Beaubrun C, Kanhai W, Martinez-Munoz C, Jakobs C, Salomons GS. Cloning and characterization of the promoter regions from the parent and paralogous creatine transporter genes. *Gene.* 2014; 533: 488-93.
48. Roseth S, Fykse EM, Fonnum F. Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *J Neurochem.* 1995; 65: 96-103.
49. Ogita K, Hirata K, Bole DG, Yoshida S, Tamura Y, Leckenby AM, Ueda T. Inhibition of vesicular glutamate storage and exocytotic release by Rose Bengal. *J Neurochem.* 2001; 77: 34-42.
50. Owens MJ, Knight DL, Nemeroff CB. Second-generation SSRIs: human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine. *Biol Psychiatry.* 2001; 50: 345-50.
51. Soudijn W, van Wijngaarden I. The GABA transporter and its inhibitors. *Curr Med Chem.* 2000; 7: 1063-79.
52. Liu QR, López-Corcuera B, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N. Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *J Biol Chem.* 1993; 268: 22802-8.

53. Mackenzie B, Loo DD, Fei Y, Liu WJ, Ganapathy V, Leibach FH, Wright EM. Mechanisms of the human intestinal H⁺-coupled oligopeptide transporter hPEPT1. *J. Biol Chem.* 1996; 271: 5430-7.
54. Corpe CP, Lee JH, Kwon O, Eck P, Narayanan J, Kirk KL, Levine M. 6-Bromo-6-deoxy-L-ascorbic acid: an ascorbate analog specific for Na⁺-dependent vitamin C transporter but not glucose transporter pathways. *J Biol Chem.* 2005; 280: 5211-20.
55. Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A. Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 289: 768-73.
56. Ohashi R1, Tamai I, Yabuuchi H, Nezu JI, Oku A, Sai Y, Shimane M, Tsuji A. Na⁽⁺⁾-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 291: 778-84.
57. Nakanishi T, Hatanaka T, Huang W, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy ME, Ganapathy V. Na⁺- and Cl⁻-coupled active transport of carnitine by the amino acid transporter ATB(0,+)₁ from mouse colon expressed in HRPE cells and *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 2001; 532: 297-304.
58. Zerangue N, Kavanaugh MP. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature.* 1996; 383: 634-7.
59. Miyauchi S, Gopal E, Fei YJ, Ganapathy V. Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na⁽⁺⁾-coupled transporter for short-chain fatty acids. *J Biol Chem.* 2004; 279: 13293-6.
60. Wong SC, Proefke SA, Bhushan A, Matherly LH. Isolation of human cDNAs that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1995; 270: 17468-75.

61. Griffiths M, Yao SY, Abidi F, Phillips SE, Cass CE, Young JD, Baldwin SA. Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem J.* 1997; 328 (Pt 3): 739-43.
62. Owens MJ, Morgan WN, Plott SJ, Nemeroff CB. Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 283: 1305-22.
63. Tatsumi M, Groshan K, Blakely RD, Richelson E. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *Eur J Pharmacol.* 1997; 340: 249-58.
64. Verrico CD, Miller GM, Madras BK. MDMA (Ecstasy) and human dopamine, norepinephrine, and serotonin transporters: implications for MDMA-induced neurotoxicity and treatment. *Psychopharmacology (Berl).* 2007; 189: 489-503.
65. Gu H, Wall SC, Rudnick G. Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *J Biol Chem.* 1994; 269: 7124-30.
66. Galli A, Jayanthi LD, Ramsey IS, Miller JW, Freneau RT Jr, DeFelice LJ. L-proline and L-pipecolate induce enkephalin-sensitive currents in human embryonic kidney 293 cells transfected with the high-affinity mammalian brain L-proline transporter. *J Neurosci.* 1999; 19: 6290-7.
67. Lin RY, Vera JC, Chaganti RS, Golde DW. Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *J Biol Chem.* 1998; 273: 28959-65.
68. Brown JM, Hanson GR, Fleckenstein AE. Regulation of the vesicular monoamine transporter-2: a novel mechanism for cocaine and other psychostimulants. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 296: 762-7.

69. Satsu H, Terasawa E, Hosokawa Y, Shimizu M. Functional characterization and regulation of the taurine transporter and cysteine dioxygenase in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Biochem J.* 2003; 375(Pt 2): 441-7.
70. Dutta B, Huang W, Molero M, Kekuda R, Leibach FH, Devoe LD, Ganapathy V, Prasad PD. Cloning of the human thiamine transporter, a member of the folate transporter family. *J Biol Chem.* 1999; 274: 31925-9.
71. Bridges RJ, Stanley MS, Anderson MW, Cotman CW, Chamberlin AR. Conformationally defined neurotransmitter analogues. Selective inhibition of glutamate uptake by one pyrrolidine-2,4-dicarboxylate diastereomer. *J Med Chem.* 1991; 34: 717-25.
72. Mitrovic AD, Johnston GA. Regional differences in the inhibition of L-glutamate and L-aspartate sodium-dependent high affinity uptake systems in rat CNS synaptosomes by L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate, threo-3-hydroxy-D-aspartate and D-aspartate. *Neurochem Int.* 1994; 24: 583-8.
73. Zuiderwijk M, Veenstra E, Lopes da Silva FH, Ghijsen WE. Effects of uptake carrier blockers SK & F 89976-A and L-trans-PDC on in vivo release of amino acids in rat hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 1996; 307: 275-82.
74. Varoqui H, Erickson JD. Active transport of acetylcholine by the human vesicular acetylcholine transporter. *J Biol Chem.* 1996; 271: 27229-32.
75. Zhou M, Engel K, Wang J. Evidence for significant contribution of a newly identified monoamine transporter (PMAT) to serotonin uptake in the human brain. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73: 147-54.
76. Boxberger KH, Hagenbuch B, Lampe JN. Common drugs inhibit human organic cation transporter 1 (OCT1)-mediated neurotransmitter uptake. *Drug Metab Dispos.* 2014; 42: 990-5.

77. Zhu HJ, Appel DI, Gründemann D, Richelson E, Markowitz JS. Evaluation of organic cation transporter 3 (SLC22A3) inhibition as a potential mechanism of antidepressant action. *Pharmacol Res.* 2012; 65: 491-6.
78. Yasumoto S, Tamura K, Karasawa J, Hasegawa R, Ikeda K, Yamamoto T, Yamamoto H. Inhibitory effect of selective serotonin reuptake inhibitors on the vesicular monoamine transporter 2. *Neurosci Lett.* 2009; 454: 229-32
79. Shitara Y. Clinical importance of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2011; 26: 220-7.
80. Nozawa T, Minami H, Sugiura S, Tsuji A, Tamai I. Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33: 434-9.
81. Tamai I, Nakanishi T. OATP transporter-mediated drug absorption and interaction. *Curr Opin Pharmacol.* 2013; 13: 859-63.
82. Imanaga J, Kotegawa T, Imai H, Tsutsumi K, Yoshizato T, Ohyama T, Shirasaka Y, Tamai I, Tateishi T, Ohashi K. The effects of the SLCO2B1 c.1457C > T polymorphism and apple juice on the pharmacokinetics of fexofenadine and midazolam in humans. *Pharmacogenet Genomics.* 2011; 21: 84-93.
83. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int.* 2013; 83: 582-92.
84. Deguchi T, Ohtsuki S, Otagiri M, Takanaga H, Asaba H, Mori S, Terasaki T. Major role of organic anion transporter 3 in the transport of indoxyl sulfate in the kidney. *Kidney Int.* 2002;

61: 1760-8.

85. Yokoo S, Yonezawa A, Masuda S, Fukatsu A, Katsura T, Inui K. Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 2007; 74: 477-87.
86. Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R. Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell.* 1978; 14: 725-31.
87. Tamai I, Ohashi R, Nezu JJ, Sai Y, Kobayashi D, Oku A, Shimane M, Tsuji A. Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *J Biol Chem.* 2000; 275: 40064-72.
88. Engel K, Wang J. Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter. *Mol Pharmacol.* 2005; 68: 1397-407.
89. Tack J, Masclee A, Heading R, Berstad A, Piessevaux H, Popiela T, Vandenberghe A, Kato H. A dose-ranging, placebo-controlled, pilot trial of Acotiamide in patients with functional dyspepsia. *Neurogastroenterol Motil.* 2009; 21: 272-80.
90. Kusunoki H, Haruma K, Hata J, Tani H, Okamoto E, Sumii K, Kajiyama G. Real-time ultrasonographic assessment of antroduodenal motility after ingestion of solid and liquid meals by patients with functional dyspepsia. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000; 15: 1022-7.
91. Talley NJ, Verlinden M, Jones M. Can symptoms discriminate among those with delayed or normal gastric emptying in dysmotility-like dyspepsia? *Am J Gastroenterol.* 2001; 96: 1422-8.
92. Sarnelli G, Caenepeel P, Geypens B, Janssens J, Tack J. Symptoms associated with impaired gastric emptying of solids and liquids in functional dyspepsia. *Am J Gastroenterol.* 2003; 98: 783-8.
93. Lorena SL, Tinois E, Brunetto SQ, Camargo EE, Mesquita MA. Gastric emptying and

- intragastic distribution of a solid meal in functional dyspepsia: influence of gender and anxiety. *J Clin Gastroenterol*. 2004; 38: 230-6.
94. Pallotta N, Pezzotti P, Calabrese E, Baccini F, Corazziari E. Relationship between gastrointestinal and extra-gastrointestinal symptoms and delayed gastric emptying in functional dyspeptic patients. *World J Gastroenterol*. 2005; 11: 4375-81.
 95. Gether U, Andersen PH, Larsson OM, Schousboe A. Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27: 375-83.
 96. In Vitro Metabolism- and Transporter Mediated Drug- Drug Interaction Studies Guidance for Industry, 2017 FDA DDI Draft Guidance
 97. FDA Guidance for Industry Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing and Labeling, 2006
 98. FDA Guidance for Industry Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations, 2012
 99. 「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」
 100. Duan H, Wang J. Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010; 335: 743-53.
 101. Engel K, Zhou M, Wang J. Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J Biol Chem*. 2004; 279: 50042-9.
 102. Xia L, Engel K, Zhou M, Wang J. Membrane localization and pH-dependent transport of a newly cloned organic cation transporter (PMAT) in kidney cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292: F682-90.
 103. Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch*. 2004; 447: 735-43.

104. Xia L, Zhou M, Kalhorn TF, Ho HT, Wang J. Podocyte-specific expression of organic cation transporter PMAT: implication in puromycin aminonucleoside nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 200; 296: F1307-13.
105. Dahlin A, Xia L, Kong W, Hevner R, Wang J. Expression and immunolocalization of the plasma membrane monoamine transporter in the brain. *Neuroscience.* 2007; 25; 146(3):

第 8 章 参考文献

本論文は学術雑誌に投稿中の以下の論文を基礎におくものである。

1. Hirayama M, Yusuke H, Yoshii K, Toda R, Kawabata K, Nakanishi T, Tamai I.
Identification of the Uptake Transporter Responsible for Distribution of Acotiamide
into Stomach Tissue. *Mol Pharm.* 2020; 17: 1071-1078.